

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE

---

DIPLOMOVÁ PRÁCE

***Analýza extraktu z listů *Andrographis paniculata*.***



Vedoucí katedry: Prof. RNDr. Luděk Jahodář, CSc.

Vedoucí diplomové práce: Prof. RNDr. Luděk Jahodář, CSc.

.

Lomnička, květen 2010

Marta Tonarová

CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE  
FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ  
DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL BOTANY AND ECOLOGY

---

## DIPLOMA THESIS

**Analysis of Andrographis leaves extract.**

Head of the department: Prof. RNDr. Luděk Jahodář, CSc.

Supervisor of the diploma thesis: Prof. RNDr. Luděk Jahodář, CSc.

Lomnička, May 2010

Marta Tonarová

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Lomnička, květen 2009

.....

podpis

Tento výstup vznikl v rámci projektu Specifického vysokoškolského výzkumu 2010-261-002.  
The work was supported by the grant SVV-2010-261-002.

Děkuji Prof. RNDr. Lud'ku Jahodářovi, CSc. za odborné vedení mé diplomové práce, cenné rady a připomínky k teoretické i experimentální části práce a všem pracovníkům katedry farmaceutické botaniky a ekologie za vytvoření dobrých pracovních podmínek. Zejména pak paní Ireně Rejlové za měření na HPLC chromatografu a Ing. Lucii Cahlíkové, PhD. Dále pak děkuji Doc. PharmDr. Jiřímu Kuneši, CSc. z katedry anorganické a organické chemie za vypracování a interpretaci NMR spekter

## OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD.....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>CÍL PRÁCE.....</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>12</b>
<b>3.1</b>	<b>Charakteristika <i>Andrographis paniculata</i> .....</b>	<b>13</b>
3.1.1	Pojmenování.....	13
3.1.2	Systematické zařazení .....	13
3.1.3	Botanický popis.....	14
3.1.4	Využívané části rostliny .....	14
3.1.5	Geografické rozšíření .....	15
3.1.6	Ekologie .....	15
<b>3.2</b>	<b>Obsahové látky .....</b>	<b>15</b>
3.2.1	Přehled jednotlivých typů sloučenin .....	15
3.2.1.1	Labdanové diterpenoidy .....	15
3.2.1.2	Flavonoidy.....	19
3.2.1.3	Ostatní .....	19
<b>3.3</b>	<b>Účinky obsahových látek .....</b>	<b>20</b>
3.3.1	Tradiční využití .....	20
3.3.2	Přehled účinků popsaných v rámci studií extraktů <i>Andrographis paniculata</i> , jednotlivých obsahových látek i komerčních přípravků .....	20
3.3.2.1	Antibakteriální aktivita.....	20
3.3.2.2	Antiprotozoální aktivita.....	21
3.3.2.3	Antimalarická aktivita .....	21
3.3.2.4	Antioxidační aktivita .....	21
3.3.2.5	Protizánětlivý účinek.....	22
3.3.2.6	Imunomodulační aktivita, vliv na některá autoimunitní onemocnění.....	23
3.3.2.7	Vliv na HIV .....	23
3.3.2.8	Antialergická aktivita .....	24
3.3.2.9	Ovlivnění jaterních funkcí.....	24
3.3.2.10	Ovlivnění ledvinných funkcí.....	25

3.3.2.11	Ovlivnění diabetes mellitus .....	25
3.3.2.12	Ovlivnění kardiovaskulárního systému .....	25
3.3.2.13	Ovlivnění respiračního systému .....	27
3.3.2.14	Antikancerózní aktivita .....	29
3.3.2.15	Další pozorované účinky .....	30
3.3.3	Toxicita.....	30
3.3.4	Bezpečnost .....	31
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>32</b>
<b>4.1</b>	<b>Materiál a vybavení.....</b>	<b>33</b>
4.1.1	Rozpouštědla a chemikálie.....	33
4.1.2	Zkoušený vzorek .....	33
4.1.3	Laboratorní pomůcky .....	33
4.1.4	Přístroje .....	34
4.1.5	Detekční činidla.....	34
4.1.6	Chromatografické adsorbenty .....	34
4.1.7	Vyvíjecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii .....	34
<b>4.2</b>	<b>Postup při kvalitativní analýze.....</b>	<b>35</b>
<b>4.3</b>	<b>Postup při ověřování standardu.....</b>	<b>35</b>
<b>4.4</b>	<b>Postup při kvantitativní analýze .....</b>	<b>35</b>
4.4.1	Příprava standardu .....	35
4.4.2	Příprava vzorku I – celý extrakt .....	36
4.4.3	Příprava vzorku II – andrographolidy .....	36
4.4.4	Podmínky HPLC stanovení.....	36
<b>4.5</b>	<b>Postup při zjišťování totožnosti hlavní obsahové složky .....</b>	<b>37</b>
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY.....</b>	<b>38</b>
<b>5.1</b>	<b>Výsledky TLC.....</b>	<b>39</b>
<b>5.2</b>	<b>NMR spektra standardu .....</b>	<b>42</b>
5.2.1	<sup>1</sup> H-NMR spektrum standardu .....	42
5.2.2	<sup>13</sup> C-NMR spektrum standardu.....	43
<b>5.3</b>	<b>Výsledky HPLC stanovení.....</b>	<b>44</b>
5.3.1	Kalibrační křivka.....	44
5.3.2	HPLC záznamy .....	45
5.3.3	Vyhodnocení obsahu andrographolidů.....	47

<b>5.4</b>	<b>NMR spektra hlavní obsahové složky .....</b>	<b>48</b>
5.4.1	<sup>1</sup> H-NMR spektrum hlavní obsahové složky.....	48
5.4.2	<sup>13</sup> C-NMR spektrum hlavní obsahové složky.....	49
<b>6</b>	<b>DISKUSE .....</b>	<b>50</b>
<b>7</b>	<b>SOUHRN .....</b>	<b>54</b>
<b>8</b>	<b>POUŽITÁ LITERATURA.....</b>	<b>56</b>
<b>9</b>	<b>ABSTRAKT .....</b>	<b>65</b>

# 1 ÚVOD

Fytoterapie, využívání léčivých účinků rostlin, má v rámci farmakoterapie bezesporu významné postavení. Existují oblasti, ve kterých především z ekonomických důvodů, představuje tradiční medicína, využívající nepřeberné množství rostlinných druhů, stále ještě jedinou možnou alternativu. Rostlinná léčiva jsou nepostradatelná i v terapii některých onemocnění, u nichž výzkum na poli syntetických léčiv doposud nepřinesl uspokojivé výsledky.

Používání rostlin je nejspíše tak staré jako lidstvo samo. Až do 18. století představoval tento empirický způsob hlavní formu léčby v rámci oficiální medicíny i lidového léčitelství. Nové poznatky a především rozvoj přírodních věd tehdejší doby umožnily rychlý nástup chemických léčiv.

Během posledních dvaceti let se lidé stále více obrací zpět k fytoterapii. Tento trend odpovídá celosvětově narůstajícímu zájmu o ekologii a přirozené léčebné prostředky. Navíc na poli chemických léčiv přichází útlum. Nová léčiva je třeba čerpat ze všech dostupných zdrojů. Přírodní léčiva, získávaná oproti syntetickým výhodně z obnovitelných zdrojů, mají jistě svůj potenciál. Podíl druhů, které doposud nebyly dostatečně fytochemicky popsány a jejichž biologická aktivita není prozkoumána, je stále značný.

Období 90. let znamenalo zejména pro střední a východní Evropu zisk nových možností, začaly k nám proudit nové rostlinné přípravky a druhy, běžně využívané tradiční medicínou zejména Indie, Číny, jižního Tichomoří, jižní Afriky a tropické Ameriky. Přínos, který tyto nové zdroje přináší, má ale i svá rizika – právě ony mnohdy neúplné nebo žádné informace o chemickém složení a farmakologických účincích.

Lidé dnes zcela běžně užívají u méně závažných obtíží či onemocnění nejrůznější rostlinné preparáty, jsou častou volbou v rámci samoléčby i prevence. Stále více z nich totiž pochybuje o rozsahu užívání syntetických léčiv a také o jejich vedlejších účincích. Mnohdy naivně je „přírodní“ považováno za zcela bezpečné. Neznalost a často matoucí, nepřesné či neúplné informace prodejců mohou ovšem způsobit řadu obtíží.

Kvalitě, účinnosti a bezpečnosti je třeba věnovat velkou pozornost i v oblasti přírodních léčiv.

*Andrographis paniculata* – česky andrografis latnatý (Acanthaceae) představuje jednu z řady rostlin, jejichž potenciál je v Evropě teprve postupně odhalován. Domácí je v některých asijských zemích – především Číně, Indii, Indonésii a Thajsku. Zejména v Indii jsou listy této tradiční léčivé rostliny využívány v rámci lidového léčitelství a ájurvedy již po staletí.



S úspěchem je také ve vlhkých, stinných oblastech pěstován. Celá řada uskutečněných studií, prováděných převážně na zvířecích modelech, potvrzuje širokou škálu možných farmakologických využití.

## **2 CÍL PRÁCE**

Cílem této diplomové práce je kvalitativní a kvantitativní analýza komerčního extraktu *Andrographis paniculata*. Jde zde o konfrontaci experimentem získaných informací o obsahových látkách a jejich množství s údaji deklarovanými dodaným výrobním protokolem. Dalším úkolem bylo ověření struktury standardu, u kterého byly pochybnosti o identitě a identifikace hlavní andrographolidové složky extraktu.

### **3 TEORETICKÁ ČÁST**

### 3.1 Charakteristika *Andrographis paniculata*

#### 3.1.1 Pojmenování

Synonyma: *Justicia paniculata* Burm. f., *Andrographis subspathulata* C.B. (larke) [1].

Místní názvy:

- |   |                                      |
|---|--------------------------------------|
| • Arabština:                                  | Qassabuzzarish                       |
| • Bengálština:                                | Kalmegh, Alui                        |
| • Čínština:                                   | Chuanxinlian                         |
| • Angličtina:                                 | The Creat, King of Bitters, Chiretta |
| • Gujarati (= Gudžarátština):                 | Kariyatu, Lilunkariyatu              |
| • Hindština:                                  | Kiryet                               |
| • Kannada (= Kannadština, dříve Kannarština): | Nelavevu                             |
| • Malaylam (= Malajálámština):                | Nelavepu, Kiriyat                    |
| • Marathi (= Maráthština):                    | Olikirayet                           |
| • Perština:                                   | Nainchavandi                         |
| • Sanskrit (= „samskrta“):                    | Kirata, Bhunimba                     |
| • Tamil (= Tamilština):                       | Nilavembu, Shirat Kuchi              |
| • Telugu (=Telugština):                       | Nelavemu [2]                         |

#### 3.1.2 Systematické zařazení

Plantae – rostliny

Embryobionta – vyšší rostliny

Spermatophyta – semenné rostliny

Angiospermophity – krytosemenné rostliny

Magnoliophyta

Magnoliopsida

Lamiidae

Scrophulariales

Acanthaceae – akantovité (paznehtíkovité)

*Andrographis paniculata* (Burm.fil.) Wall. ex Nees – andrografis latnatý [3]

### 3.1.3 Botanický popis

#### Makroskopický:

*Andrographis paniculata* je vzpřímená, lysá, jednoletá, hojně větvená bylina s výškou do 90 cm, větvení je výrazně čtverhranné, často intenzivně ve svrchní části. Listy jsou jednoduché, v opozici, krátce řapíkaté, 2 – 7 cm dlouhé a 1 – 3 cm široké, kopinaté, lysé, mírně vlnité, světlé vespod, zašpičatělé. Řapíky jsou dlouhé 0 – 6 mm. Květy jsou růžové v samostatných, axilárních a terminálních latách [1]. Kalich je pětičetný. Koruna je malá, obvykle nevýrazná ale skvrnitá, purpurově a hnědě tečkovaná, na bazi trubkovitá, více či méně vydutá, význačně dvoupyská. Horní pysk je dvouklaný, spodní je odchýlený, trojlaločný a barevný. Plodem je obdélníková či eliptická kapsle, stlačená v pravých úhlech do přehrádky, obsahuje 4 – 12 semen. Semena jsou tvrdá, hluboce svraštělá, lysá [2].

#### Mikroskopický:

##### List:

Obě, tedy spodní i svrchní, epidermis vykazují přítomnost žlaznatých trichomů. Lithocysty jsou na svrchní epidermis v porovnání se spodní poměrně velké. Spodní epidermis obsahuje vrstvu vlnostěnných buněk a diacytický typ průduchů, které na horní chybí [1].

##### Stonk:

Epidermis obsahuje žláznaté i nežláznaté trichomy. Kolenchym se nachází hustě v rozích stonku (rohový kolenchym). Sekundární floém sestává zejména z jehlicovitých vláken. Vláknina xylému jsou podlouhlá a zesílená. Cévy se stupňovitým a spirálovitým ztluštěním. Parenchymatické buňky dřeně obsahují malé jehlicovité krystaly šťavelanu vápenatého [1].

### 3.1.4 Využívané části rostliny

Drogu tvoří sušené nadzemní části, přednostně listy a stonky [1].

### 3.1.5 Geografické rozšíření

*Andrographis paniculata* je léčivá rostlina široce používaná v několika asijských zemích [4]. Vyskytuje se hojně na pláních Indie, Srí Lanky, kontinentální Číny a Tajvanu [5]. Je také pěstován v zahradách, zvláště v Bengálsku [2].

### 3.1.6 Ekologie

Tato rostlina roste divoce jako plevel na okrajích cest v nadmořské výšce od 0 do 700 m n. m. a je původní v asijských regionech [6].

## 3.2 Obsahové látky

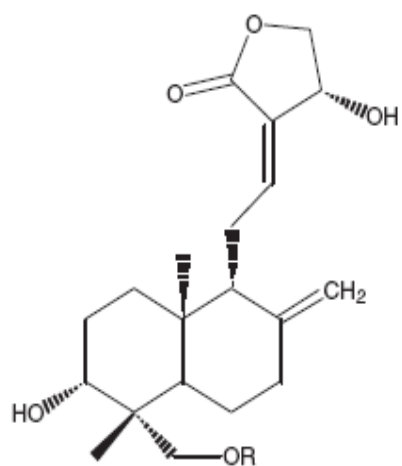
Četné fytochemické analýzy poukazují na obsah diterpenových laktonů, flavonoidů (především flavonolů a flavonů) a glykosidů odvozených od obou skupin.

Fytochemické studie této rostliny dosáhly izolace asi 50 labdanových diterpenoidů, stejně jako i 30 flavonoidů [7]. Hlavní složkou je diterpenový lakton andrographolid s koncentrací 0,5 – 0,9 % [1].

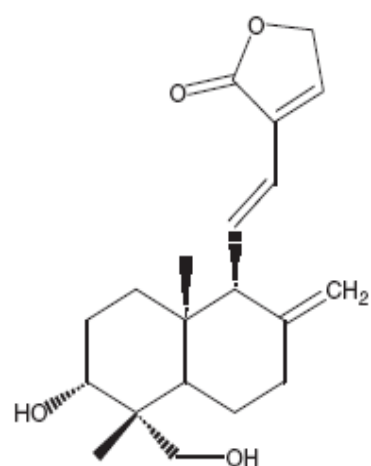
### 3.2.1 Přehled jednotlivých typů sloučenin

#### 3.2.1.1 Labdanové diterpenoidy

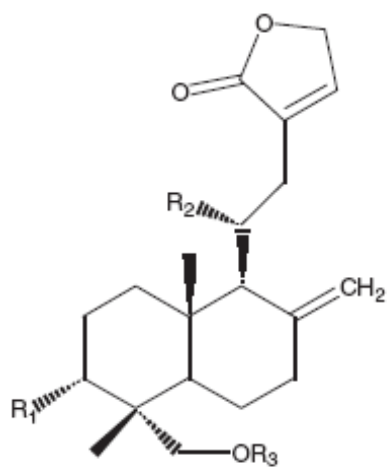
- 1) andrographolid
- 2) 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolid
- 3) 14-deoxyandrographolid
- 4) 14-deoxy-15-isopropylidene-11,12-didehydroandrographolid
- 5) 14-deoxy-11-hydroxyandrographolid
- 6) neoandrographolid
- 7) andrographosid [5]



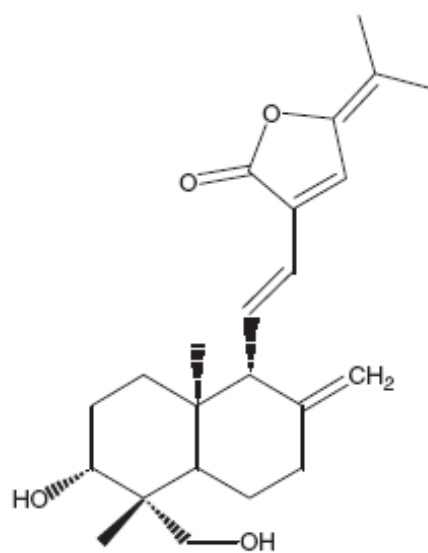
- 1) R  
H  
7) glc



2)

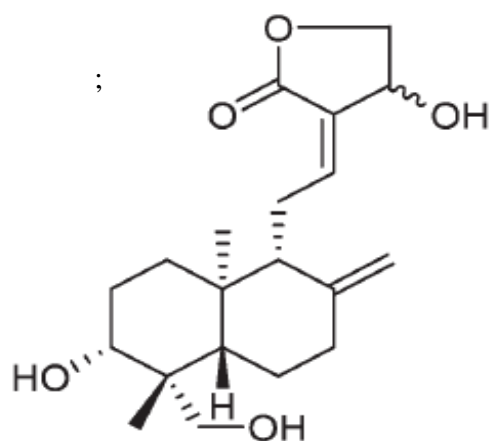


- |    |                |                |                |
|----|----------------|----------------|----------------|
|    | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> |
| 3) | OH             | H              | H              |
| 5) | OH             | OH             | H              |
| 6) | H              | H              | glc            |



4)

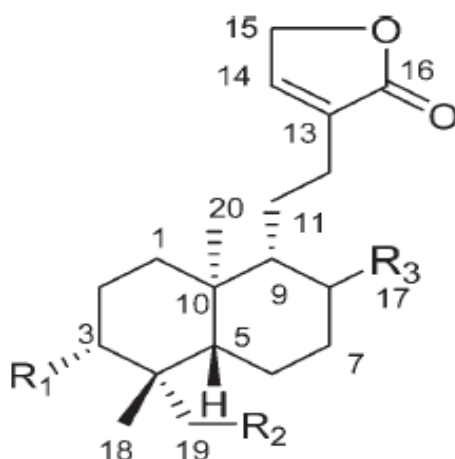
8) isoandrographolid [8]




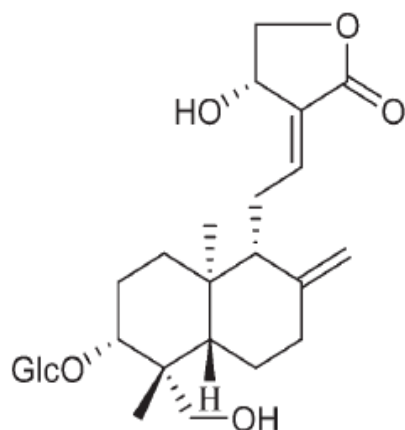
8)



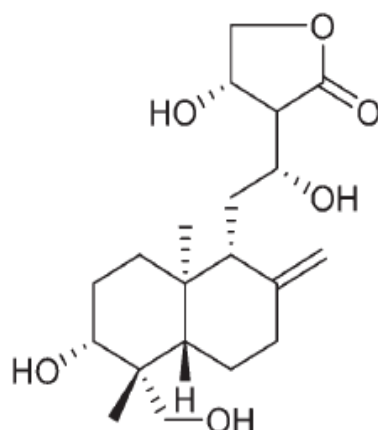
- 9) bis-andrographolid ether [9]
- 10) 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-14,19-dideoxyandrographolid
- 11) 14-deoxy-17 $\beta$ -hydroxyandrographolid
- 12) 19-*O*-[ $\beta$ -D-apiofuranosyl(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopyranosyl]-3,14-dideoxyandrographolid
- 13) 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosylandrographolid
- 14) 12*S*-hydroxyandrographolid
- 15) andrographatosid  
(19-carboxylic acid-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-8(17),13-*ent*-labdadien-15,16-diol)
- 16) 8,17-epoxy-14-deoxyandrographolid
- 17) 14-deoxy-12-hydroxyandrographolid [10]



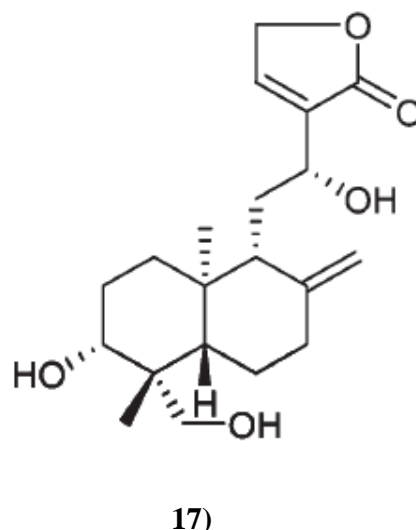
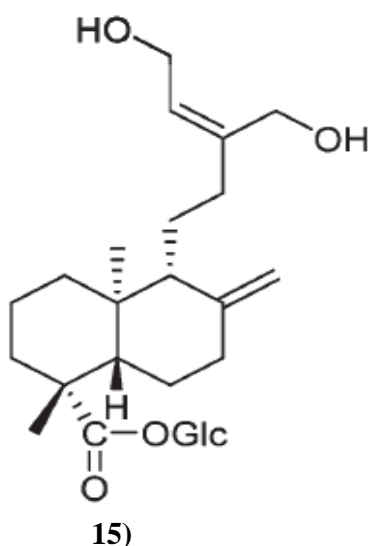
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
<b>10)</b>	OGlc	H	=CH <sub>2</sub>
<b>11)</b>	OH	OH	$\beta$ -CH <sub>2</sub> OH
<b>12)</b>	H	OApi(1 $\rightarrow$ 2)Glc	=CH <sub>2</sub>
<b>16)</b>	OH	OH	



**13)**



**14)**



- 18) 12-*epi*-14-deoxy-12-methoxyandrographolid
- 19) 14-deoxy-12-methoxyandrographolid
- 20) 14-deoxy-11-oxoandrographolid
- 21) bisandrographolid B
- 22) bisandrographolid C [10]
- 23) kyselina andrographová
- 24) andrographidin A [11]
- 25) 7R-hydroxy-14-deoxyandrographolid
- 26) 7S-hydroxy-14-deoxyandrographolid
- 27) 12S,13S-hydroxynandrographolid
- 28) 12R,13R-hydroxynandrographolid
- 29) 3,14-dideoxyandrographolid
- 30) 3-oxo-14-deoxyandrographolid
- 31) 3-oxo-14-deoxy-11,12-didehydroandrographolid
- 32) andrographisid
- 33) 15-methoxy-3,19-dihydroxy-8(17),11,13-*ent*-labdatrien-16,15-olid
- 34) 8(17),13-*ent*-labdadiene-15,16,19-triol
- 35) 3,15,19-trihydroxy-8(17),13-*ent*-labdadien-16-oic acid
- 36) 3,19-dihydroxy-14,15,16-trinor-8(17),11-*ent*-labdadiene-13-oic acid
- 37) 3,12,19-trihydroxy-13,14,15,16-tetranor-*ent*-labd-8(17)-en [12]
- 38) 3-*O*-β-D-glucopyranosyl-14-deoxyandrographisid
- 39) 3-*O*-β-D-glucopyranosyl-14-deoxy-11,12-didehydroandrographisid [13]

- 40) andrographolakton [14]
- 41) 8 $\alpha$ -methoxyl-14-deoxy-17 $\beta$ -hydroxyandrographolid [15]
- 42) (13R,14R)3,13,14,19-terahydroxy-*ent*-labda-8(17),11-dien-16,15-olid
- 43) 3,19-isopropylidene-14-deoxy-*ent*-labda-8(17),13-dien-16,15-olid [6]
- 44) andrograpanin
- 45) 14-deoxyandrographosid
- 46) 8-methylandrographolid [6]

### 3.2.1.2 Flavonoidy

- 1) 7-*O*-methyldihydrowogonin
- 2) dihydroskullcapflavon I
- 3) 7-*O*-methylwogonin
- 4) 5-hydroxy-7,8,2',5'-tetramethoxyflavon
- 5) 5-hydroxy-7,8,2',3'-tetramethoxyflavon
- 6) 5-hydroxy-7,2',6'-trimethoxyflavon
- 7) skullcapflavone I 2'-methylether
- 8) 7-*O*-methylwogonin 5-*O*-glucosid
- 9) skullcapflavone I 2'-glucosid
- 10) (2S)-5,7,2',3'-tetramethoxyflavanon
- 11) 5-hydroxy-7,2',3'-trimethoxyflavon [5]
- 12) 5-hydroxy-7,8-dimethoxyflavanone-5-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid
- 13) 5-hydroxy-7,8, 2',5'-tetramethoxyflavone-5-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid [11]
- 14) 5-hydroxy-7,8, 2'-trimethoxyflavon
- 15) 5-hydroxy-7,8-dimethoxyflavon
- 16) 5-hydroxy-7,8, 2',5'-tetramethoxyflavon [16]

### 3.2.1.3 Ostatní

- 1)  $\beta$ -sitosterol
- 2) kys. skořicová
- 3) kys. kávová
- 4) kys. chlorogenová
- 5) kys. ferulová [5]

### 3.3 Účinky obsahových látek

#### 3.3.1 Tradiční využití

Tinktura z kořene je tonikum, stimulans a má také jemně projímavý účinek. Vylisovaná šťáva z listů samotná nebo dohromady s kardamomem, hřebíčkem a skořicí, zpracovaná do malých kuliček, se předepisuje jako domácí prostředek při nepravidelné stolici, nechutenství, nadýmání a průjmů u dětí. Je také anthelmintikem.

Odvar či nálev z listů byl s uspokojivými výsledky použit při potížích s játry, neuralgii, určitých formách dyspepsie spojených s plynatostí, celkové sešlosti, v rekonvalescenci po horečkách a v rámci pokročilého stupně dyzentérie. Během chřipkové epidemie, v rámci progresu tohoto onemocnění, je výtažek z rostliny velmi účinný. Užitečný je i při navracejících se nebo střídavých horečkách.

O rostlině se udává, že účinkuje jako adstringens, anodynum, tonikum a antidotum a je prospěšná při dyzenterii, choleře, cukrovce, chřipce, bronchitidě, otocích, svrbění kůže, hemeroidech a kapavce.

Je využíván při poruše sekrece žluči, žloutence. Listy a kořeny jsou také používány jako stomachikum a cholagogum [2].

#### 3.3.2 Přehled účinků popsaných v rámci studií extraktů *Andrographis paniculata*, jednotlivých obsahových látek i komerčních přípravků

##### 3.3.2.1 Antibakteriální aktivita

V rámci testování antibakteriálních a antifungálních účinků vodného extraktu *Andrographis paniculata*, frakce andrographolidu a frakce arabinogalaktanových proteinů, s využitím antibiotických disků a difúzní metody, se podařilo prokázat, že vodný extrakt vykazuje významnou antimikrobiální aktivitu vůči *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Candida albicans*. Hodnocení proběhlo ve vztahu k známým účinným antibiotikům [17].

V rámci in vitro screeningu několika běžně používaných léčivých rostlin Malajsie, taktéž s využitím diskové difúzní metody a hodnocením přítomnosti respektive nepřítomnosti inhibičních zón a hodnot MIC, vykazoval vodný extrakt *Andrographis paniculata* antibakteriální aktivitu proti některým testovaným grampozitivním - *Staphylococcus aureus*

a methicilin-rezistentnímu *Staphylococcus aureus*, ale také vůči gramnegativní *Pseudomonas aeruginosa* [18].

#### 3.3.2.2 Antiprotozoální aktivita

Při hledání nových sloučenin, aktivních proti *Toxoplasma gondii*, byl pozitivně vyhodnocen andrographolid a to s  $IC_{50}$  nižší než 1  $\mu\text{g/ml}$  [19].

Čtyři xanthony, izolované z kořenů *Andrographis paniculata*, byly podrobeny in vitro zkouškám na antiprotozoální účinek vůči *Trypanosoma brucei brucei*, *Trypanosoma cruzi* a *Leishmania infantum*. Z výsledků plyne, že 1,8-dihydroxy-3,7-dimethoxyxanthon vykazoval účinek proti *Trypanosoma cruzi* a 1,2-dihydroxy-6,8-dimethoxyxanthon byl aktivní vůči *Trypanosoma brucei brucei* i *Leishmania infantum* [20].

#### 3.3.2.3 Antimalarická aktivita

Ukázalo se, že má *Andrographis paniculata* významné antimalarické vlastnosti vůči *Plasmodium falciparum* (in vitro) a *Plasmodium berghei* (in vivo), zároveň výsledky in vitro testů prokázaly lepší efekt chloroformového extraktu oproti methanolickému [6].

Bylo publikováno, že listy *Andrographis paniculata* vykazují antimalarickou aktivitu. Z listů izolovaný andrographolid, neoandrographolid, deoxyandrographolid a andrographisid vykazovaly antimalarické účinky proti *Plasmodium berghei* NK65 u infikovaných kryš mnohobradavkových. V rámci předkládané studie bylo ale prokázáno, že chloroformová frakce, izolovaná z kořenů rostliny, má vyšší účinnost než z listů. Účinný in vitro a také in vivo byl 1,2-dihydroxy-6,8-dimethoxyxanthon [21].

#### 3.3.2.4 Antioxidační aktivita

V rámci in vitro systému bylo prokázáno, že methanolický extrakt *Andrographis paniculata* inhibuje tvorbu volných radikálů odvozených od kyslíku, konkrétně superoxidu (32%), hydroxylových radikálů (80%) ale i oxidu dusnatého (42,8%) a peroxidaci lipidů (80%). In vivo studie s využitím BALB/c myších modelů, u kterých byl pro indukci využit PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate), také deklarují významnou inhibici tvorby superoxidu (32,4%) a oxidu dusnatého (65,3%) [22].

U AKR myši s lymfomem byl studován efekt vodného extraktu *Andrographis paniculata* na antioxidační obranný systém v játrech. Antioxidační aktivita byla hodnocena monitorováním

katalázy, superoxid dismutázy a glutathion S-transferázy. Podávání p.o. vodného extraktu *Andrographis paniculata* v různých dávkách způsobuje významné zvýšení aktivity těchto enzymů [23].

U všech testovaných modelových systémů, při koncentraci 50 µg/ml a hodnocení inhibice xanthin oxidázy a peroxidace lipidů, vykazoval vodný extrakt *Andrographis paniculata* vyšší antioxidační aktivitu než ethanolický [24].

### 3.3.2.5 Protizánětlivý účinek

*Andrographis paniculata* způsobuje významný pokles prozánětlivých, zánětlivých a alergických mediátorů. Ze shrnutí výsledků citované studie lze dedukovat, že je *Andrographis paniculata* velmi silně účinný v tlumení zánětu tím, že inhibuje mediátory prozánětlivé – oxid dusnatý, IL-1 beta, IL-6, zánětlivé – PGE2, TXB2 a alergické – LTB4. Inhibice PGE2 a zároveň TXB2 signalizuje, že extrakt aktivně inhibuje vznik produktů COX metabolismu [25].

Vzhledem k dříve prokázané protizánětlivé aktivitě ethylacetátové frakce *Andrographis paniculata*, byly jednotlivé aktivní složky izolovány a bylo u nich dokázáno, že významně inhibují transkripci NF-kappaB v LPS/IFN-gamma stimulovaných RAW 264.7 makrofázích. Všechny tyto složky výrazně snižují sekreci TNF-alfa, IL-6, MIP-2 a oxidu dusnatého u LPS/INF- gamma stimulovaných RAW 264.7 buněk [26].

V rámci studie, zaměřené na přepokládaný vliv andrographolidu na biosyntézu eikosanoidů a faktor aktivující trombocyty (PAF), se ukázalo, že andrographolid nemá vliv na biosyntézu eikosanoidů a že v závislosti na dávce inhibuje PAF-indukovanou agregaci krevních destiček v lidské krvi. Tyto výsledky naznačují, že má andrographolid jiný mechanismus účinku než nesteroidní antiflogistika, spojený s kardiovaskulární a antitrombotickou aktivitou popisovanou u *Andrographis paniculata* [27].

U LPS-indukovaných TNF-alfa a GM-CSF získaných z myších peritoneálních makrofágů byla prokázána inhibice andrographolidem. Zároveň byla potlačena LPS-indukovaná exprese mRNA těchto dvou cytokinů, což přispívá k protizánětlivému efektu. V in vivo testu při simulaci alergického zánětu plic potlačil andrographolid významně hromadění bronchoalveolární tekutiny a téměř úplně odstranil hromadění bílých krvinek a eosinofilů. Toto je jasný důkaz, že andrographolid je efektivně protizánětlivý in vitro i v živém organismu a ovlivňuje jak nespecifický tak na základě interakce antigen/protilátka vzniklý zápal plic [28].

### 3.3.2.6 Imunomodulační aktivita, vliv na některá autoimunitní onemocnění

Co se týče ovlivnění imunitních funkcí, byly zjištěny a prezentovány rozličné závěry.

Byly prokázány imunostimulační vlastnosti *Andrographis paniculata*. Ethanolický extrakt *Andrographis paniculata* a čištěný andrographolid vyvolaly výraznou stimulaci protilátek a opožděného typu hypersenzitivity (DTH) u myší imunizovaných ovčími červenými krvinkami (SRBC). Rostlinný preparát také stimuloval nespecifickou imunitní odpověď zvířat, měřenou pomocí indexu migrace makrofágů při fagocytóze *Escherichia coli* značených <sup>14</sup>C-leucinem a pomocí proliferace slezinných lymfocytů [29].

Studie různých experimentálních modelů in vitro i in vivo prokázala imunomodulační aktivitu směsi andrographolidů (andrographolid, 14-deoxyandrographolid, 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolid). Experimentální nálezy mimo jiné demonstrují, že tato směs dokáže zvrátit imunosupresi vyvolanou cyklofosfamidem [30].

In vitro, byl andrographolid schopen zasahovat do proliferace T-buněk a uvolňování cytokinů v rámci odpovědi na alogenní stimulaci. Bylo pozorováno, že expozice dendritických buněk andrographolidem zcela ruší aktivaci T-buněk dendritickými buňkami. Andrographolid zasahuje do zrání dendritických buněk a jejich schopnosti prezentovat antigen T-buňkám. Vzhledem k zjištění, že je andrographolid schopen inhibovat aktivaci T-buněk, byly provedeny testy zaměřené na ovlivnění experimentální autoimunitní encefalomyelitidy (EAE), zánětlivého demyelinizačního onemocnění CNS, které je prvořadě zprostředkované CD4(+) T-buňkami a slouží jako zvířecí model pro lidskou roztroušenou sklerózu. Podávání andrographolidu myším významně redukovalo EAE symptomy inhibicí T-buněk a protilátkovou odpovědí směřovanou na myelinové antigeny [31].

Prospektivní, randomizovaná, dvojité zaslepená, placebem kontrolovaná studie, zaměřená na ovlivnění pacientů s revmatoidní artritidou (RA) podáváním tablet *Andrographis paniculata*, s hodnocením pomocí vizuální analogové škály bolesti, prokázala u pacientů užívajících tablety *Andrographis paniculata* pokles bolesti oproti skupině s placebem [32].

### 3.3.2.7 Vliv na HIV

První fáze šest týdnů trvající klinické studie, do které se zapojilo třináct HIV infikovaným (během studie neužívali antivirotika) a pět zdravých dobrovolníků, prokazuje, že podávání andrographolidu vedlo k nárůstu počtu CD4(+) T-buněk u HIV subjektů [33].

### 3.3.2.8 Antialergická aktivita

Při testování andrographolidu a neoandrographolidu byla pozorována výrazná anti-PCA aktivita (PCA – pasivní kožní anafylaxe). Obě složky také stabilizovaly žírné buňky, působily proti jejich degranulaci vyvolané vaječným bílkem. Tyto účinky byly srovnatelné s disodium kromoglykátem [34]

### 3.3.2.9 Ovlivnění jaterních funkcí

#### *Hepatoprotektivní účinek*

U andrographolidu, andrographisidu a neoandrographolidu byly zkoumány protektivní účinky vůči hepatotoxicitě, indukované u myší intoxikací tetrachlormethanem nebo terciálním butylhydroperoxidem. Předběžné podávání těchto diterpenů myším (100 mg/kg, i.p.) po tři dny vyvolalo významnou redukci tvorby malondialdehydu a degradace glutathionu. Srovnání se známým hepatoprotektivem silymarinem poukazuje, že andrographolid vykazuje nižší protektivní potenciál než andrographisid a neoandrographolid, které jsou stejně efektivní jako silymarin, s ohledem na jejich účinky na tvorbu degradačních produktů peroxidace lipidů a uvolňování glutamát-pyruvát transaminázy a alkalín fosfatázy do séra. Hladina glutathionu se vrátila do normálu pouze při podávání neoandrographolidu. Silnější protektivní aktivita andrographisidu a neoandrographolidu může být dána přítomností glykosidových skupin, které působí jako silné antioxidanty [35].

U andrographolidu, v závislosti na dávce (0,75 – 12 mg/kg p.o. 7x denně), byla prokázána protektivní aktivita vůči toxicitě, vyvolané paracetamolem na izolovaných krysích hepatocytech. Zcela vyrušil toxické účinky paracetamolu na některé enzymy (glutamát-oxalacetát transaminázu, glutamát-pyruvát transaminázu, alkalín fosfatázu), jak v séru tak v izolovaných jaterních buňkách [36].

#### *Choleretický účinek*

Andrographolid působí významný, na dávce závislý (1,5 – 12 mg/kg), choleretický účinek (4,8 – 73%), jak je patrné ze zvýšeného toku žluči, žlučových solí a žlučových kyselin u krys a anestezovaných morčat. Preventivní podávání andrographolidu zabránilo poklesu objemu žluči, který byl indukován paracetamolem. Bylo zjištěno, že je andrographolid účinnější než silymarin, klinicky užívané hepatoprotektivum [37].



### 3.3.2.10 Ovlivnění ledvinných funkcí

Vodný extrakt připravený z celé rostliny *Andrographis paniculata* vykazoval u samců potkana kmene Wistar albino významné renoprotektivní účinky proti nefrotoxicitě vyvolané gentamicinem. Extrakt zmírnil gentamicinem indukované zvýšení hladin kreatininu v séru a urey v séru i krvi [38].

### 3.3.2.11 Ovlivnění diabetes mellitus

Byla uskutečněna studie antihyperglykemických a antioxidačních účinků ethanolického extraktu nadzemních částí *Andrographis paniculata* u potkanů normálních a u potkanů se streptozotocinem indukovaným diabetes mellitus typu I. Potkanům byla po 14 dní podávána destilovaná voda, metformin nebo extrakt. Na konci studie bylo vyhodnoceno, že extrakt, stejně jako metformin, ve srovnání s vehikulem významně snižuje tělesnou hmotnost a hladinu sérové glukózy u diabetických potkanů, ale nemá žádný vliv na obojí u normálních potkanů [39].

Ze sledování účinku *Andrographis paniculata* na B-buňky pankreatu, vyplynulo, že *Andrographis paniculata* je velmi silné, na dávce závislé agens, podporující uvolňování insulinu. Působí na jeden z membránových receptorů, především ATP-dependentní draslíkové kanály. Jakožto insulinové sekretagogum tak potenciálně způsobuje hypoglykémii [40].

In vitro testy ethanolického extraktu *Andrographis paniculata* a andrographolidu prokázaly, že extrakt, v závislosti na koncentraci, vykazuje výrazný inhibiční účinek vůči alfa-glukosidáze ( $IC(50)=17.2\pm 0.15$  mg/ml) a slabou inhibiční aktivitu vůči alfa-amyláze ( $IC(50)=50.9\pm 0.17$  mg/ml). Andrographolid prokazuje obdobnou inhibiční aktivitu vůči oběma enzymům ( $IC(50)=11.3\pm 0.29$  mg/ml). Především inhibice alfa-glukosidázy je tak nejspíše jeden z mechanismů antidiabetického účinku extraktu. Extrakt *Andrographis paniculata* tak lze považovat za potenciálního kandidáta k zvládnutí diabetes mellitus II. typu [41].

### 3.3.2.12 Ovlivnění kardiovaskulárního systému

#### *Ovlivnění agregace krevních destiček*

Ze sledování antitrombotického efektu v prevenci infarktu myokardu plyne, že preparát z kořenů *Andrographis paniculata*, obsahující flavony, podporuje syntézu PGI<sub>2</sub>, inhibuje produkci TXA<sub>2</sub>, stimuluje syntézu cAMP v krevních destičkách, brání jejich agregaci a tímto napomáhá zabránit vzniku trombů a rozvoji infarktu myokardu [42].

In vitro testy inhibice agregace krevních destiček za použití tří hlavních diterpenoidů, přinesly tyto výsledky: andrographolid a 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolid významně potlačují trombinem indukované hromadění krevních destiček a to v závislosti jak na koncentraci (1-100 mikromol) tak na čase, zatímco neoandrographolid vykazuje malou a nebo žádnou aktivitu. Byl také hodnocen inhibiční mechanismus andrographolidu a 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolidu, přičemž možnou cestou, která nejspíše přispívá k antiagregační aktivitě těchto dvou sloučenin, je inhibice extracelulární signálem-regulované kinázy (ERK1/2). Navíc standardizované vodné extrakty *Andrographis paniculata*, obsahující různá množství andrographolidu, inhibují agregaci rozdílně. Extrakt s vyšším obsahem andrographolidu vykázal méně inhibiční aktivity proti trombinu než extrakt s jeho nižším obsahem. Z čehož plyne, že standardizovaný extrakt *Andrographis paniculata* může kromě andrographolidu a 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolidu obsahovat i jiné antiagregační sloučeniny, které přispívají k zmíněné vysoké inhibiční aktivitě [43].

#### *Ovlivnění aterosklerotických změn*

Experimentální studie prevence aterosklerotické arteriální stenózy a restenózy po angioplastice s využitím *Andrographis paniculata* a rybího tuku prokázala, že *Andrographis paniculata* může zmírnit aterosklerotickou stenózu iliakální tepny, zapříčiněnou jak narušením endotelu, tak stravou s vysokým obsahem cholesterolu a také restenózu následující po angioplastice u králíků. Rybí tuk (přes 70% omega-3 polynenasycených mastných kyselin) vykazoval stejné, ovšem v porovnání s *Andrographis paniculata* nižší účinky. Oba in vivo inhibují sekreci růstových faktorů krevními monocyty. Zároveň byla snížena aktivita Ca-ATPasy buněčné membrány u aterosklerotických králíků, obzvláště po podávání *Andrographis paniculata*. *Andrographis paniculata* výrazně potlačuje buněčný růst nebo DNA syntézu a to v závislosti na dávce [44].

#### *Hypotenzní účinek*

Bylo prokázáno, že vodný extrakt *Andrographis paniculata* snižuje systolický tlak u spontánně hypertenzních potkanů – SHR i jejich normotenzivní kontroly, Wistar-Kyoto potkanů – WKY, při chronickém intraperitoneálním podávání infuzí za použití osmotických pump. U SHR, kterým byl podáván extrakt ve srovnání s kontrolní skupinou za použití vehikula, byla aktivita angiotenzin-konvertujícího enzymu v plasmě, ne však v plicích, výrazně nižší, stejně tak i hladina thiobarbiturové kyseliny. Mechanismem účinku se tedy zdá být

jak snižování cirkulujícího angiotenzin-konvertujícího enzymu v plazmě, tak pokles úrovně volných radikálů v ledvinách [45].

#### *Kardioprotektivní účinky*

Syrový extrakt z *Andrographis paniculata* a jeho flavonoidní frakce API0134 prokazatelně chrání psí srdce při ischemicko-reperfučních poškozeních [46, 47].

Za využití kardiomyocytů neonatálních potkanů byly sledovány kardioprotektivní účinky některých diterpenových laktonů *Andrographis paniculata*. Předběžné podávání andrographolidu, ne však ostatních sloučenin, chrání kardiomyocyty před poškozením hypoxií/reoxygenací, zvyšuje buněčný redukováný glutathion a aktivitu antioxidantních enzymů [48].

#### 3.3.2.13 Ovlivnění respiračního systému

##### *Infekce horních dýchacích cest (chřipka, nachlazení, faryngitida)*

Systematické review a metaanalýza, které zhodnotily dostupné literární zdroje a randomizované kontrolované studie, zaměřené na využití *Andrographis paniculata* při symptomatické léčbě infekcí horních dýchacích cest, přinesly tyto závěry (kritériím vyhověly pouze čtyři z původních sedmi studií) :

- extrakt *Andrographis paniculata* ve fixní kombinaci s *Eleutherococcus senticosus* versus placebo:

Obě hodnocené studie, zahrnující celkem 225 pacientů, nedošly k výrazným rozdílným výsledkům. *Andrographis paniculata* v této fixní kombinaci vynikal nad placebem v redukci obtíží provázejících infekci horních dýchacích cest.

- extrakt *Andrographis paniculata* versus placebo:

Ze studie ovlivnění příznaků nachlazení, jíž se zúčastnilo 208 pacientů, plyne, že byl *Andrographis paniculata* opět celkově účinnější ve snižování intenzity příznaků.

Jedna z dalších studií, porovnávající efekt čistého extraktu a placeba, využila k hodnocení také počet dní, který pacienti strávili na nemocenské, počet pacientů, kteří se zcela uzdravili a počet pacientů, kterým se od příznaků ulevilo. Pacienti v léčené skupině, užívající *Andrographis paniculata*, strávili na nemocenské méně dní, více z nich dosáhlo úplného uzdravení i celkové úlevy od příznaků.

- extrakt *Andrographis paniculata* versus paracetamol:

Jedna ze studií, zahrnující 152 pacientů s faryngotonsilitidou, porovnávala účinnost vysokých (6g/den) a nízkých (3g/den) dávek *Andrographis paniculata* a paracetamolu. Účinnost byla hodnocena jako úleva od horečky a jako vymizení, zlepšení, nezlepšení a nebo naopak zhoršení bolesti v krku. Výrazné rozdíly efektivity při eradikaci obou výše zmíněných příznaků byly zaznamenány třetí den u vysoké dávky *Andrographis paniculata* a paracetamolu na jedné straně a nízké dávky *Andrographis paniculata* na straně druhé. Závěrečný, tedy sedmý den, nebyly již mezi skupinami pozorovány žádné rozdíly, téměř všichni pacienti byli bez horečky a bolesti v krku.

Důležité je také zmínit, že kromě jedné studie, využívající sušené listy *Andrographis paniculata*, byl ve všech ostatních použit komerční preparát Kan Jang vyráběný v Swedish Herbal Institute [49].

I další systematické review vyhodnotilo Kan Jang, který standardně obsahuje 5,25 mg andrographolidu a deoxyandrographolidu v jedné tabletě, jako nejvíce testovaný produkt s obsahem *Andrographis paniculata*, podávaný při infekcích horních dýchacích cest. Andrographolid, diterpenový lakton, je považován za hlavní aktivní složku. Další možné aktivní součásti představují neoandrographolid, andrographisid, 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolid, deoxyandrographolid a arabinogalaktanové proteiny. Kan Jang byl testován jako jednosložkový preparát, obsahující pouze *Andrographis paniculata*, ale také jako kombinovaný produkt s *Eleutherococcus senticosus*. Uskutečněné klinické studie představují odůvodněný a přesvědčivý důkaz, že *Andrographis paniculata* účinně redukuje intenzitu a délku trvání infekcí horních dýchacích cest, je-li jeho podávání započato v prvních 36 až 48 hodinách od nástupu příznaků [50].

Využití extraktu *Andrographis paniculata* v prevenci infekcí horních dýchacích cest se věnovala randomizovaná, dvojitě zaslepená, kontrolovaná studie, které se zúčastnilo 107 zdravých osmnáctiletých subjektů v Chile. Subjektům ve zkušební skupině bylo podáváno denně 200 mg standardizovaného extraktu *Andrographis paniculata* (Kan Jang, Swedish Herbal Institute) po dobu tří měsíců. Každý týden zhodnotil lékař přítomnost či nepřítomnost infekce horních dýchacích cest u vše subjektů. Třebaže v incidenci infekce horních dýchacích cest nebyl během prvních dvou měsíců pozorován žádný rozdíl, projevil se výrazně během třetího měsíce, tedy na konci studie – u 16 z 54 subjektů v léčené skupině ve srovnání s 33 z 53 v kontrolní skupině byla diagnostikována infekce horních dýchacích cest. Riziko infekce horních dýchacích cest je tedy ve zkušební skupině 2,1 krát nižší než ve skupině s placebem [50].

Mechanismus účinku *Andrographis paniculata* v léčbě infekce horních dýchacích cest zůstává doposud nejasný. Nebylo shledáno, že by vykazoval podstatné baktericidní

nebo protivirové vlastnosti. Budeme-li vycházet z testování na zvířatech, je zřejmé, že je výše zmíněný účinek založen buď na protizánětlivých nebo na imunomodulačních vlastnostech této rostliny [50].

#### *Asthma bronchiale*

Trvalá aktivace nukleárního faktoru NF-kappaB byla spojena s rozvojem astmatu. Andrographolid vykazoval inhibiční aktivitu vůči NF-kappaB, tak vznikla hypotéza, že by mohl zásahem do NF-kappaB cesty mírnit alergické astma. Testy byly prováděny na BALB/c myších, u kterých byl senzitivizací ovoalbuminem vyvolán zánět dýchacích cest. Andrographolid, obdobně jako v lidských epiteliálních bronchiálních buňkách, blokuje v jaderných extraktech, získaných z plicní tkáně těchto myší, p65 nukleární translokaci a DNA vazebnou aktivitu. Tyto nálezy potvrzují potenciální terapeutickou hodnotu andrographolidu v léčbě astmatu. Andrographolid působí inhibicí na úrovni NF-kappaB cesty a to aktivací inhibiční kappa-B kinázy-beta [51].

#### 3.3.2.14 Antikancerózní aktivita

Celá řada studií se zabývala účinku extraktu *Andrographis paniculata* a jednotlivých izolovaných sloučenin na nerůznější typy rakovinných buněčných linií. Z nalezených studií lze jmenovat například studie zabývající se vlivem na buňky HL-60 akutní myeloidní leukémie, buňky HT-29 nádoru kolonu, LOVO buňky kolorektálního karcinomu, buňky A-431 epidermálního nádoru, buňky A549 nemalobuněčného karcinomu plic, PC-3 rakovinné buňky prostaty, buňky Hep3B hepatocelulárního karcinomu, žaludeční nádorové buňky a buňky TD-47 rakoviny prsu.

Extrakt *Andrographis paniculata* a samotný andrographolid mají stimulační efekt na produkci cytotoxických T-lymfocytů, což se děje skrze zvýšenou sekreci IL-2 a INF-gamma T-buňkami a čímž také inhibují růst nádoru [52].

Při podávání andrographolidu bylo prokázáno, že vykazuje přímou antikancerózní aktivitu – u rakovinných buněk, zastavuje jejich buněčný cyklus v G0/G1 fázi a to indukci buněčný cyklus inhibujícího proteinu p27 a snížením exprese cyklin-dependentní kinázy 4 (CDK4). Andrographolid také zvyšuje produkci TNF-alfa a expresi CD markerů, což má za následek vzestup cytotoxické aktivity lymfocytů vůči rakovinným buňkám, tedy nepřímý antikancerózní účinek [53].

TNF-related apoptosis – inducing ligand (TRAIL) je důležitý člen rodiny TNF s obrovským potenciálem v léčbě rakoviny. Ukázalo se, že předběžné podávání andrographolidu podstatně podporuje u různých lidských rakovinných buněčných linií apoptózu, vyvolanou TRAIL a to i v TRAIL-rezistentních buňkách [54].

Andrographolid indukuje v lidských rakovinných buňkách apoptózu skrze aktivaci kaspasy 8 na vnějším receptoru smrti s následnou spoluúčastí mitochondrií. Klíčovými mediátory toho procesu jsou proapoptičtí členové rodiny Bcl-2 (Bid a Bax) [55].

#### 3.3.2.15 Další pozorované účinky

Při testování vodného extraktu *Andrographis paniculata* a andrographolidu byla potvrzena potenciální analgetická a antiedematózní aktivita [24].

Pokusy na potkanech prokázaly, že andrographolid vykazuje výrazný antipyretický účinek – tři hodiny po podání při indukované pyrexii, významná je také jeho antiulcerózní aktivita vůči aspirinem způsobené ulceraci [56].

Suchý extrakt *Andrographis paniculata* vyvolal relaxaci děložního svalstva bloádou kalciových kanálů a inhibicí influxu vápenatých iontů [57].

Andrographolid, neoandrographolid a 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolid vykazovaly viricidní aktivitu proti herpes simplex virus 1 (HSV-1) [58].

U etanolického extraktu *Andrographis paniculata* a andrographolidu bylo prokázáno, že inhibují lytický cyklus viru Ebstein-Barrové [59].

#### 3.3.3 Toxicita

Nalezené toxikologické studie se zaměřovaly především na ovlivnění fertility a reprodukce. Závěry, vyplývající z některých pokusů, jsou poněkud rozporuplné.

Dle jedné ze studií, vedlo každodenní perorální podávání 20 mg prášku ze suchých listů *Adnrographis paniculata* u samců potkana albino po dobu 60 dnů k zástavě spermatogenze, degenerativním změnám v semenotvorných tubulech, regresy Leydigových buněk a také k degenerativním změnám nebo regresi v nadvarlatech, semenných váčcích, prostatě a ke zmenšení pohlavních žláz [60].

Další studie však tyto závěry negují. Při podávání extraktu *Adrographis paniculata* v dávkách 20, 200 a 1000 mg/kg po 60 dní nebyla u potkaních samců prokázána žádná testikulární toxicita – vyhodnocení bylo prováděno pomocí váhy reprodukčních orgánů,

hystologie varlat, analýzy Leydigových buněk a měření hodnot testosteronu [61]. I novější testování vlivu standardizovaného extraktu *Andrographis paniculata* s obsahem andrographolidu vyšším než 10%, v různých denních dávkách od 0, 20, 200 až po 1000 mg/kg u samců potkana Wistar albino, po dobu 65 dní před pářením a 21 dní během páření, neprokázalo žádné známky toxicity. Ve zkušební skupině byly hladiny testosteronu i indikátory plodnosti srovnatelné se skupinou kontrolní. Celkový objem spermatu ani motilita spermií nebyly ovlivněny. Varlata a nadvarlata nevykazovala žádné velikostní ani histopatologické změny [62].

Studován byl také účinek extraktu z listů *Andrographis paniculata* na krevní hladinu progesteronu u březích samic potkana. Perorální podávání 200, 600 a 2000 mg/kg během prvních 19 dní březosti nemělo na progesteron žádný efekt. Lze tedy konstatovat, že extrakt nemůže způsobit progesteronem zprostředkované přerušení březosti [63].

Potenciální genotoxicita standardizovaného extraktu *Andrographis paniculata* byla ověřována různými in vitro testy, zahrnujícími Amesův test, sledování chromozomálních aberací a Mikronukleus test. Z výsledků je evidentní, že je extrakt z hlediska genotoxicity bezpečný [64].

#### 3.3.4 Bezpečnost

Řada klinických studií se shoduje, že perorálně podávaná surovina je subjekty velmi dobře tolerována [65, 66, 67].

Nežádoucí účinky, které byly doposud ve studiích publikovány, jsou mírné, vzácné a spontánně mizející. Nicméně většina těchto studií byla příliš krátkého trvání (obecně dva týdny a méně), nelze tedy hodnotit bezpečnost při delším podávání. Pozorované nežádoucí účinky zahrnují alergickou reakci, únavu, bolest hlavy, bolest lymfatických uzlin, lymfadenopatii, nauzeu, průjem a kovovou chuť [50].

Z hlediska případných kontraindikací, lékových interakcí a interakcí s jinými rostlinnými drogami je třeba zohlednit některé účinky prokázané pouze na zvířatech, především pak antikoagulační, hypotenzní a hypoglykemické vlastnosti.

## **4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**



## 4.1 Materiál a vybavení

### 4.1.1 Rozpouštědla a chemikálie

#### Rozpouštědla

Aceton, p.a. ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ )

Benzen, p.a. ( $\text{C}_6\text{H}_6$ )

Ethanol 96%, denaturovaný benzínem (EtOH)

Chloroform, p.a. ( $\text{CHCl}_3$ )

Methanol, p.a. (MeOH)

#### Chemikálie

Kyselina sírová 2N

Vanilín, substance, 99%

Voda čištěná

#### Standard:

Andrographolide 98%, Sigma - Aldrich (2009-2010)

365645 – 100 mg

CAS Number 5508-58-7

MW 350,46

### 4.1.2 Zkoušený vzorek

Jedná se o ethanolický extrakt ze sušených listů *Andrographis paniculata*. Deklarován je jako nazelenalý prášek, hořké chuti, s obsahem andrographolidů ne nižším než 10 %. Extrakt byl získán jako komerční vzorek od indické firmy Amsar Private Limited a jeho analytický protokol je datován k 20. září 2006. Oficiální označení extraktu je Andrographis Paniculate P. E. 10:1.

### 4.1.3 Laboratorní pomůcky

chromatografické komory

kádinky

mikropipety + špičky

odměrné baňky

odměrné válce  
odpařovací baňky  
Pasteurovy pipety  
pipetovací balónek  
skleněné nálevky  
skleněné pipety  
skleněné tyčinky  
vialky  
zkumavky

#### 4.1.4 Přístroje

Analytické váhy, Sartorius  
Horkovzdušný vysoušeč, BaByliss  
Kapalinový chromatograf, Philips PU4110 UV/VIS  
Spektrometr, Varian – Vx BB 300 MHz  
Sušárna  
Ultrazvuková lázeň, Sonorex Super 10P, Bandeline  
UV-lampa, Lamag  
Vakuová rotační odparka (+ vodní lázeň), Büchi Rotavapor R-114

#### 4.1.5 Detekční činidla

D 1: *Vanilín – kyselina sírová činidlo:*

se připraví smísením 1% ethanolického roztoku vanilínu a 2N kyseliny sírové v poměru 1:2.

#### 4.1.6 Chromatografické adsorbenty

A 1: TLC hliníkové deska Silikagel 60 F<sub>254</sub> (s fluorescenčním indikátorem), tloušťka vrstvy 0,2 mm, 20×20cm, MERCK

#### 4.1.7 Vyvíjecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii

S 1: CHCl<sub>3</sub>+ CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>+ C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> 20:20:10

S 2: CHCl<sub>3</sub>+ CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>+ C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> 20:15:10

## 4.2 Postup při kvalitativní analýze

Roztok vzorku byl připraven rozpuštěním 20 g extraktu *Andrographis paniculata* ve 100 ml methanolu, což při deklarovaném, tedy předpokládaném obsahu 10 % andrographolidů odpovídá 2% koncentraci. Vzorek byl pro lepší rozpuštění zahříván na vodní lázni při maximální teplotě 40°C, následně přefiltrován. 2% roztok standardu byl připraven rozpuštěním 10 mg v 0,5 ml methanolu.

Na chromatogram 1 byly nanесeny tři různé koncentrace vzorku (V1, V2, V3) a standard. Jako mobilní fáze byla použita směs chloroform, aceton, benzen v poměru 20:20:10. Detekce byla provedena nejprve pod UV, následně postřikem činidlem Vanilín – kyselina sírová při zahřátí na 100°C

Na chromatogram 2 byl nanесen vzorek, standard a směs standardu se vzorkem. Poměr mobilní fáze byl upraven na 20:15:10. Detekce byla shodná.

## 4.3 Postup při ověřování standardu

K ověření standardu bylo provedeno měření jeho NMR spekter.

$^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektra byla měřena v roztocích  $\text{CDCl}_3$  nebo  $\text{CD}_3\text{OD}$  při laboratorní teplotě na přístroji VARIAN - Vx BB 300 MHz, pracujícím při 300 MHz pro  $^1\text{H}$  a při 75 MHz pro  $^{13}\text{C}$ . Chemické posuny byly změřeny jako hodnoty  $\delta$  v ppm a byly nepřímě vztaženy k tetramethylsilanu (TMS) jako standardu pomocí zbytkového signálu rozpouštědla (7.26 pro  $^1\text{H}$  a 77.0 pro  $^{13}\text{C}$  pro  $\text{CDCl}_3$  resp. 3.30 pro  $^1\text{H}$  a 49.0 pro  $^{13}\text{C}$  pro  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

## 4.4 Postup při kvantitativní analýze

### 4.4.1 Příprava standardu

1 mg standardu byl navážen do 10ml odměrné baňky, která byla po rysku doplněna methanolem. Tento základní roztok o koncentraci 0,1 mg/ml byl dále ředěn, byly získány další dvě koncentrace 0,05 mg/ml a 0,01 mg/ml. Všechna tři ředění posloužila k sestrojení kalibrační křivky.

#### 4.4.2 Příprava vzorku I – celý extrakt

Pro dosažení koncentrace 500 µg/ml bylo nejprve naváženo 100 mg extraktu *Andrographis paniculata* do 100ml odměrné baňky, následně doplněné po rysku methanolem. Pro lepší rozpuštění byl roztok zahříván na vodní lázni s teplotou do 40°C. Po odstátí bylo 5 ml toho roztoku odebráno do odměrné baňky na 10 ml a její objem byl po rysku doplněn methanolem.

#### 4.4.3 Příprava vzorku II – andrographolidy

Obdobným způsobem jako výše byl připraven roztok celého extraktu *Andrographis paniculata* o koncentraci 500 µg/ml. Pro zlepšení rozpustnosti bylo 100 mg extraktu se 100 ml methanolu umístěno do ultrazvukové lázně – nejprve na 3 minuty při 35°C, poté ještě na 5 minut při 40°C. 5ml tohoto roztoku bylo přeneseno do odměrné baňky na 10 ml a doplněno methanolem po rysku. Do vialky bylo mikropipetou odebráno 0,2 ml a toto množství bylo nanášeno na celou šířku chromatografické desky. Po stranách byli označeni tzv. „stopaři“. Proběhlo vyvinutí desky v komoře sycené směsí chloroform, aceton a benzen v poměru 20:20:10. „Stopaři“ byli odstřiženi, vizualizace proběhla činidlem Vanilín – kyselina sírová v sušárně při 100°C. Pod UV, s pomocí stopařů, byla označena spodní a vrchní hranice oblasti, ve které byl předpokládán výskyt látek, spadajících do skupiny andrographolidů. Pás byl vystřižen a rozstříhán na čtverečky o velikosti cca 1x1 cm, ke kterým bylo v kádince přidáno nejprve 20 ml methanolu. Po opatrném promísení a odstátí bylo přidáno dalších 10 ml methanolu. Obsah byl přes filtrační papír Pasteurovou pipetou přenesen do odpařovací baňky. Tato extrakce byla s dalšími 10 ml methanolu opakována ještě dvakrát. Filtrační papír byl promyt. Proběhlo odpaření do sucha. Pro rozpuštění bylo přidáno 5 ml methanolu.

#### 4.4.4 Podmínky HPLC stanovení

Pumpa: Philips PU4100

Detektor: Philips PU4110 UV/VIS

Kolona: Merck, Purospher RP-18 endcapped, 5µm, 240x4 mm

Vlnová délka: 223 nm

Průtok: 1,0 ml/min

Fáze: MeOH/H<sub>2</sub>O 65:35 isokraticky

Nástřik: 20 µl

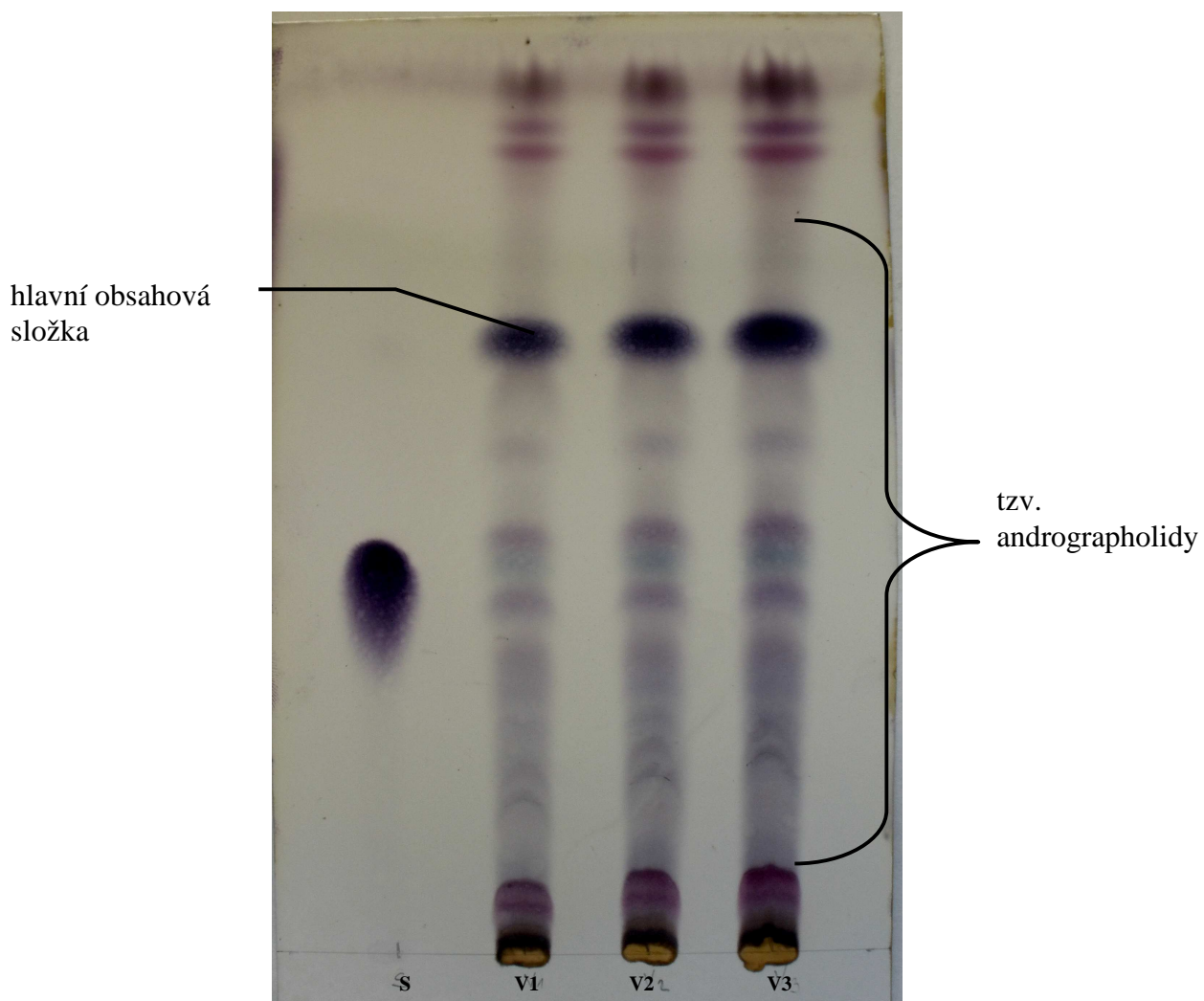
Podmínky pro HPLC byly stanoveny obdobně jako v literatuře [1]. Stanovení proběhlo dvakrát.

#### 4.5 Postup při zjišťování totožnosti hlavní obsahové složky

Pomocí preparativní TLC byla v první řadě získána čistá látka (čistota byla ověřována pomocí TLC). Na dvě hliníkové folie v celé šířce byl nanesen 2% roztok extraktu *Andrographis paniculata* se „stopaři“ po stranách. Vyvíjení proběhlo v mobilní fázi chloroform, aceton, benzen v poměru 20:20:10. „Stopaři“ byli odstřiženi, vizualizace proběhla činidlem Vanilín – kyselina sírová při zahřátí na 100°C. Na středních částech byl s využitím této kontroly a UV označen pás hlavní obsahové složky, který byl z obou desek vypreparován do kádinky s methanolem. Po odstátí byl roztok převeden přes Pasteurovu pipetu s vatou do odpařovací baňky a odpařen do sucha. Tímto způsobem bylo získáno 7 mg látky, jejíž NMR spektra byla měřena za stejných podmínek jako u standardu (viz výše).

## **5 VÝSLEDKY**

## 5.1 Výsledky TLC



Obr. 1 Chromatogram 1 – Standard a tři různé koncentrace vzorku

Popis:

S – standard

V1 – nejnižší koncentrace vzorku

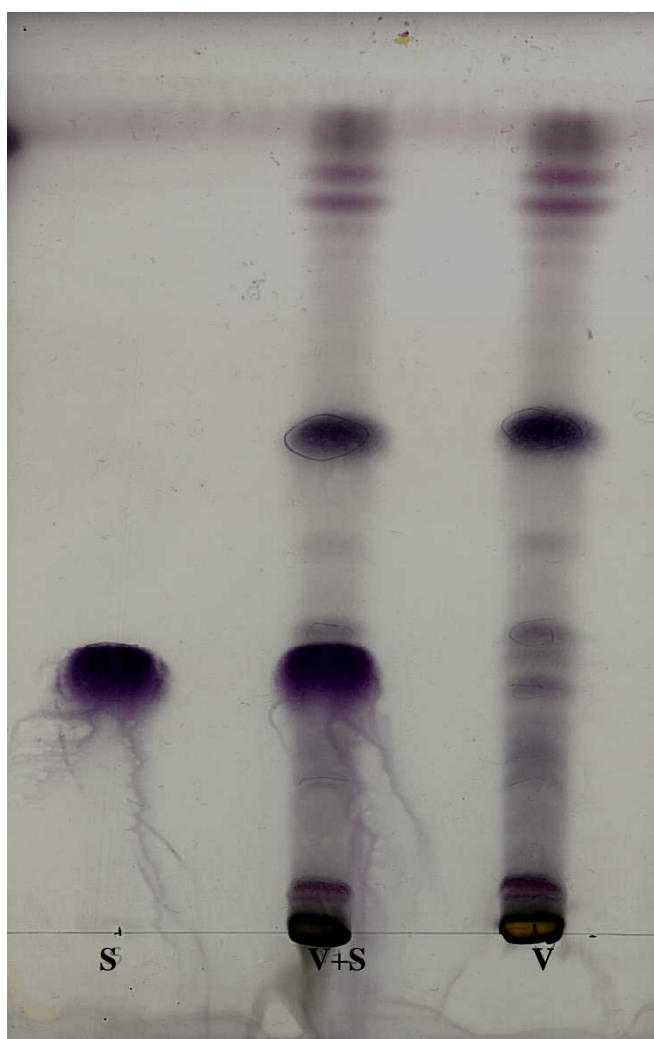
V2 – střední koncentrace vzorku

V3 – nejvyšší koncentrace vzorku

Mobilní fáze: S 1:  $\text{CHCl}_3 + \text{CH}_3\text{COCH}_3 + \text{C}_6\text{H}_6$  20:20:10

Stacionární fáze: A 1: Silikagel 60 F<sub>254</sub>

Detekce: UV 254 nm, D 1: Vanilín – kyselina sírová činidlo



Obr. 2 Chromatogram 2 – Standard, vzorek se standardem, samotný vzorek

Popis:

S – standard

V+S – směs vzorku a standardu

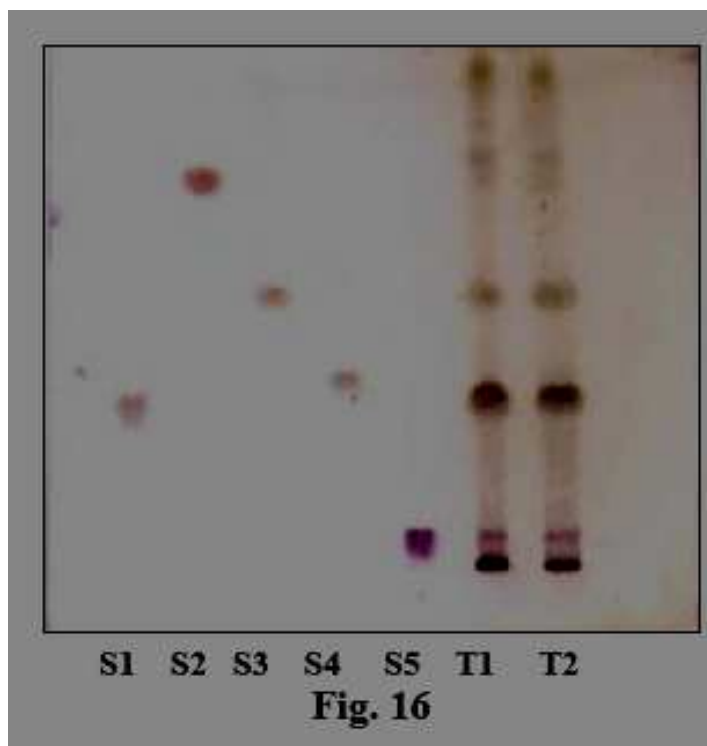
V – vzorek

Mobilní fáze: S 2:  $\text{CHCl}_3 + \text{CH}_3\text{COCH}_3 + \text{C}_6\text{H}_6$  20:15:10

Stacionární fáze: A 1: Silikagel 60 F<sub>254</sub>

Detekce: UV 254 nm, D 1: Vanilín – kyselina sírová činidlo





Obr. 3 TLC profil extraktu *Andrographis paniculata* ze studované literatury [2]

Popis:

S1 – andrographolid

S2 – andrograpanin

S3 – 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolid

S4 – isoandrographolid

S5 – neoandrographolid

T1, T2 – extrakt *Andrographis paniculata*

Mobilní fáze:  $\text{CHCl}_3 + \text{CH}_3\text{COCH}_3 + \text{C}_6\text{H}_6$  20:20:10

Stacionární fáze: neuvedena

Detekce: 10% směs kyseliny sírové a methanolu [2]

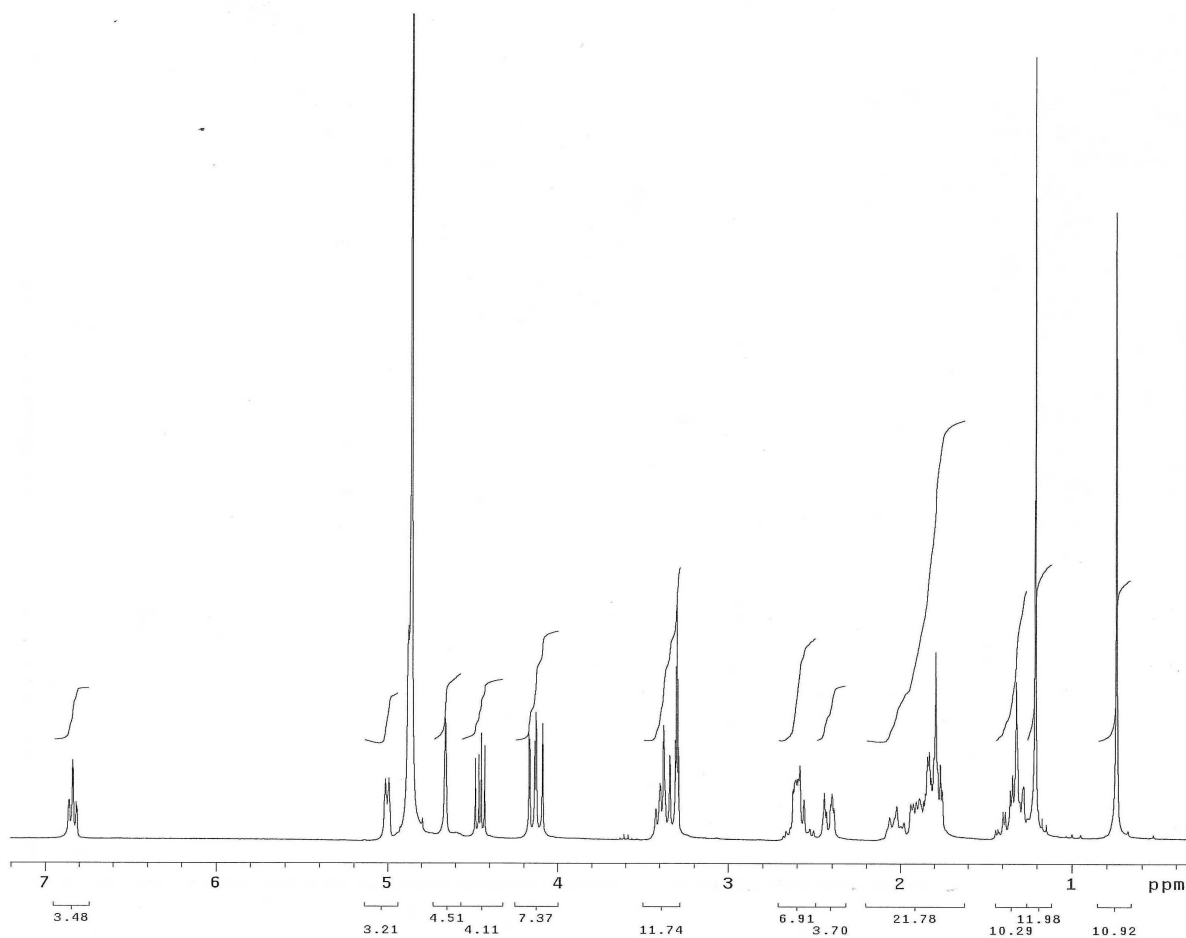
Standard andrographolidu reagoval vznikem fialové skvrny. Jeho  $R_f$  v chromatogramu 1 bylo 0,36 a v chromatogramu 2 0,32, což zhruba odpovídá TLC profilu z literatury. Z TLC analýzy vyplývá, že nelze předpokládat, že je andrographolid dominující složkou zkoušeného extraktu. Pokud je ve vzorku přítomen, pak ve stopovém množství. Jako jeho hlavní obsahová složka byla určena látka s fialovou skvrnou o  $R_f$  0,65 (chromatogram 1) a 0,60 (chromatogram 2). Pro kvantitativní analýzu byla vymezena oblast, kde lze předpokládat výskyt tzv. andrographolidů. (Blíže viz obr. 1).

## 5.2 NMR spektra standardu

Data jsou prezentována v následujícím pořadí - chemický posun ( $\delta$ ), integrovaná intenzita (v protonovaných spektrech), multiplicita (s: singlet, d: dublet, t: triplet, dd: dublet dubletů, ddd dublet dubletu dubletů, m: multiplet), interakční konstanta (Hz) a přiřazení.

### 5.2.1 $^1\text{H}$ -NMR spektrum standardu

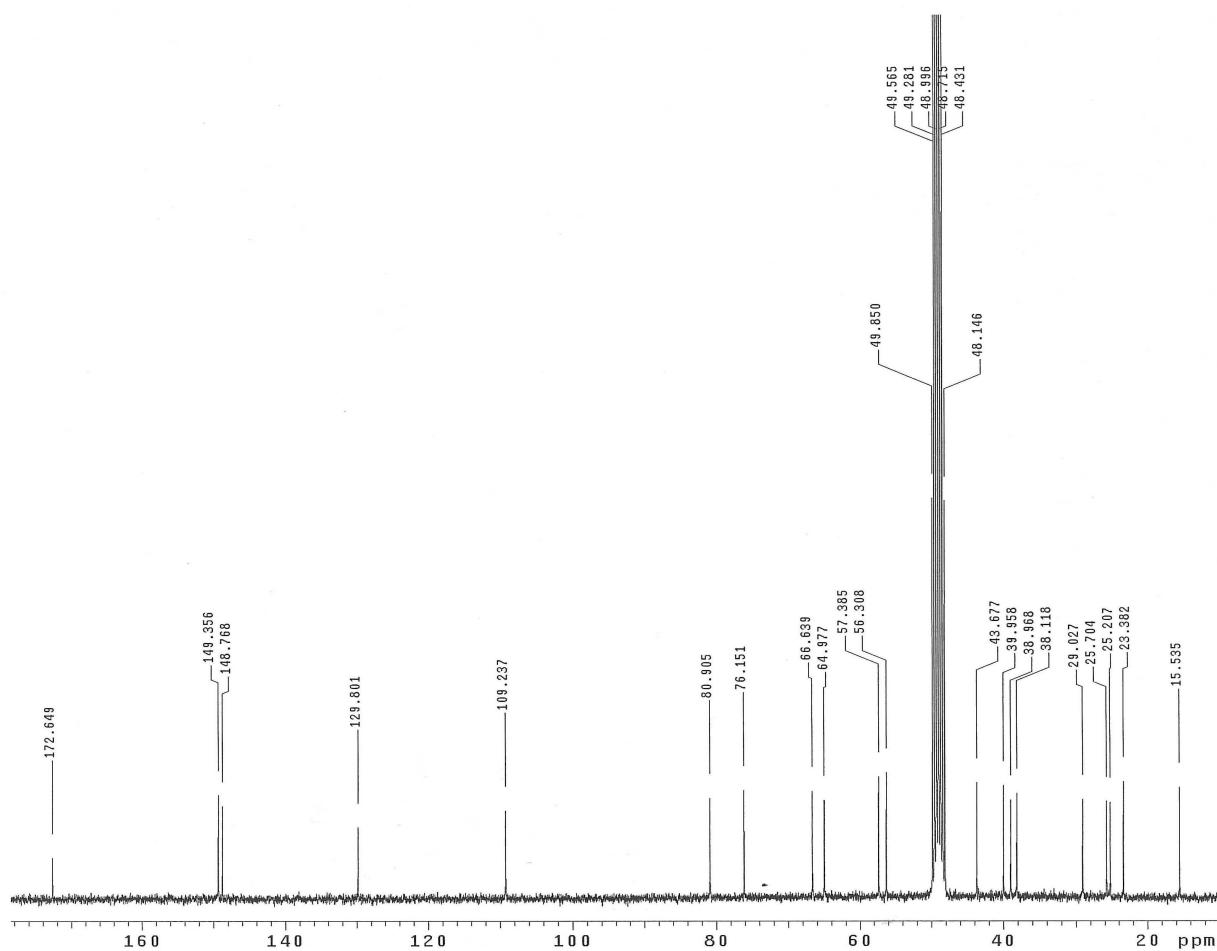
$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  6.84 (1H, dt,  $J=6.6$  Hz,  $J=1.6$  Hz, H12), 5.03-4.98 (1H, m, H14), 4.89-4.87 (1H, m, H17), 4.66 (1H, s, H17), 4.45 (1H, dd,  $J=10.3$  Hz,  $J=6.1$  Hz, H15), 4.15 (1H, dd,  $J=10.3$  Hz,  $J=1.9$  Hz, H15), 4.11 (1H, d,  $J=11.2$  Hz, H19), 3.44-3.33 (2H, m, H3, H19), 2.68-2.49 (2H, m, H11), 2.49-2.34 (1H, m, H7), 2.12-1.69 (6H, m, H1, H2, H6, H7, H9), 1.44-1.26 (3H, m, H1, H5, H6), 1.21 (3H, s, H18), 0.74 (3H, s, H20)



Obr. 4  $^1\text{H}$ -NMR spektrum standardu

### 5.2.2 $^{13}\text{C}$ -NMR spektrum standardu

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  172.6, 149.4, 148.8, 129.8, 109.2, 80.9, 76.2, 66.6, 65.0, 57.4, 56.3, 43.7, 40.0, 39.0, 38.1, 29.0, 25.7, 25.2, 23.4, 15.5



Obr. 5  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrum standardu

Získaná data byla porovnána s literaturou [68, 69]. Na základě toho lze konstatovat, že standard odpovídá struktuře andrographolidu.

### 5.3 Výsledky HPLC stanovení

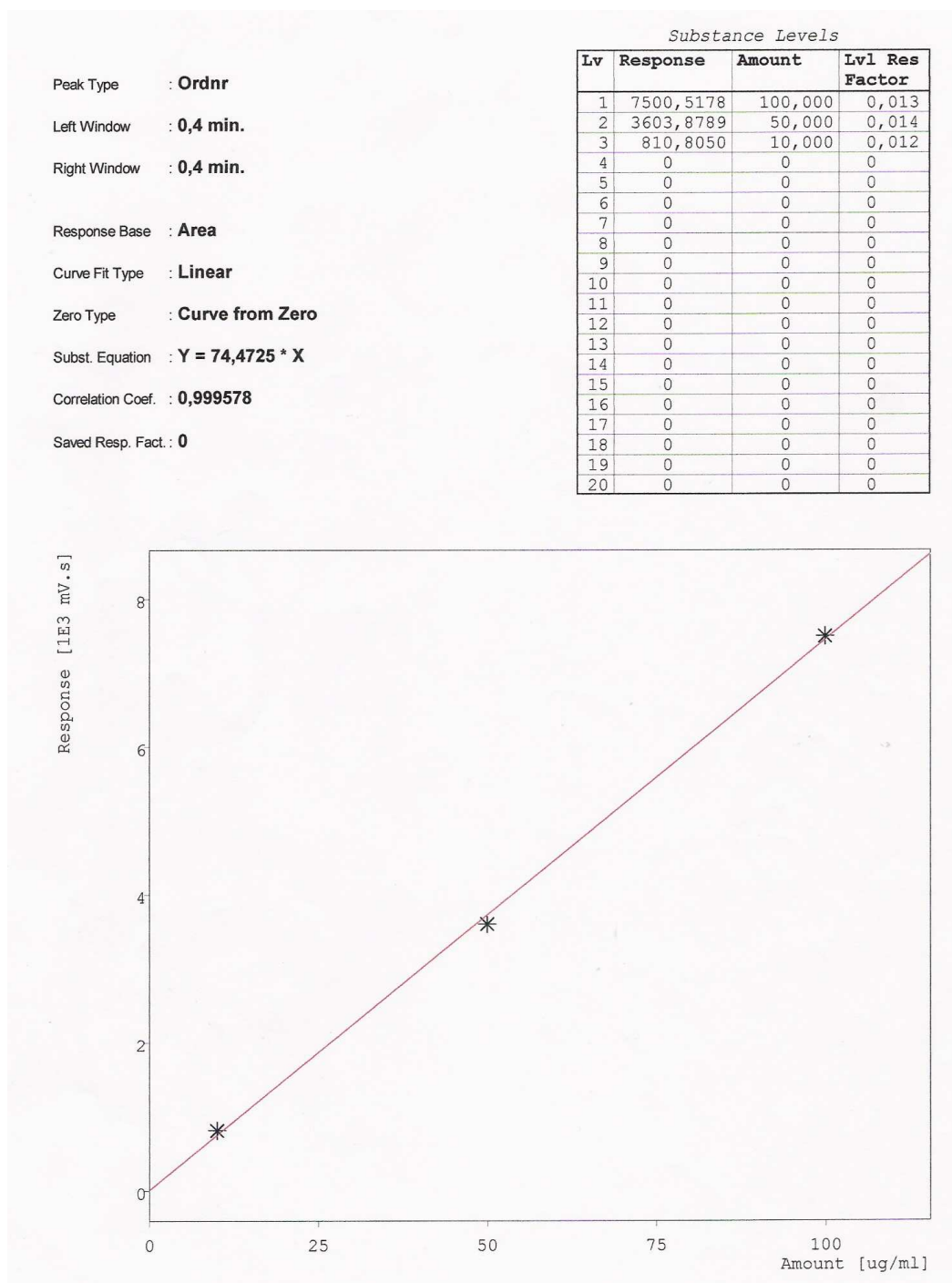
#### 5.3.1 Kalibrační křivka

Kalibrační křivka byla sestavena z tří analýz na každé ze tří koncentračních úrovní.

Metoda je od 10 µl/ml do 100 µl/ml lineární.

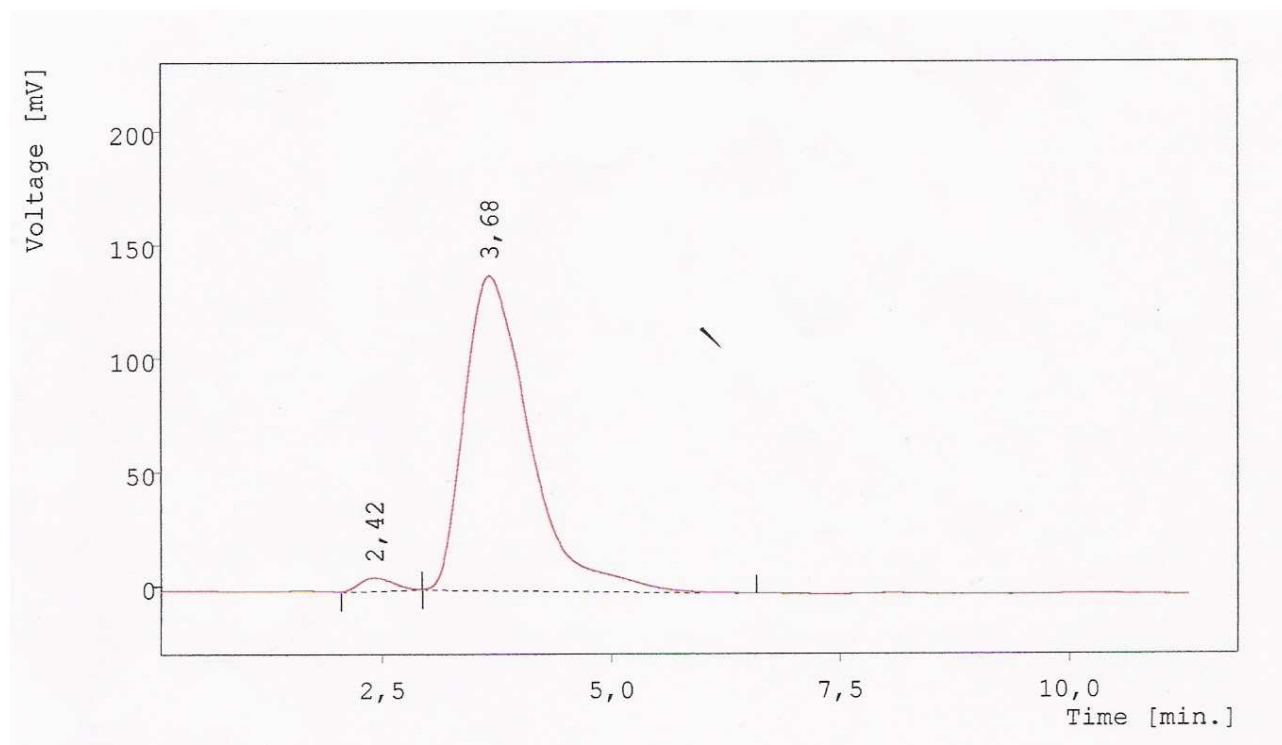
Rovnice přímky:  $Y = 74,4725 \times X$   $r = 0,999578$

Směrodatná odchylka analýz se pohybovala kolem 2,5 %.

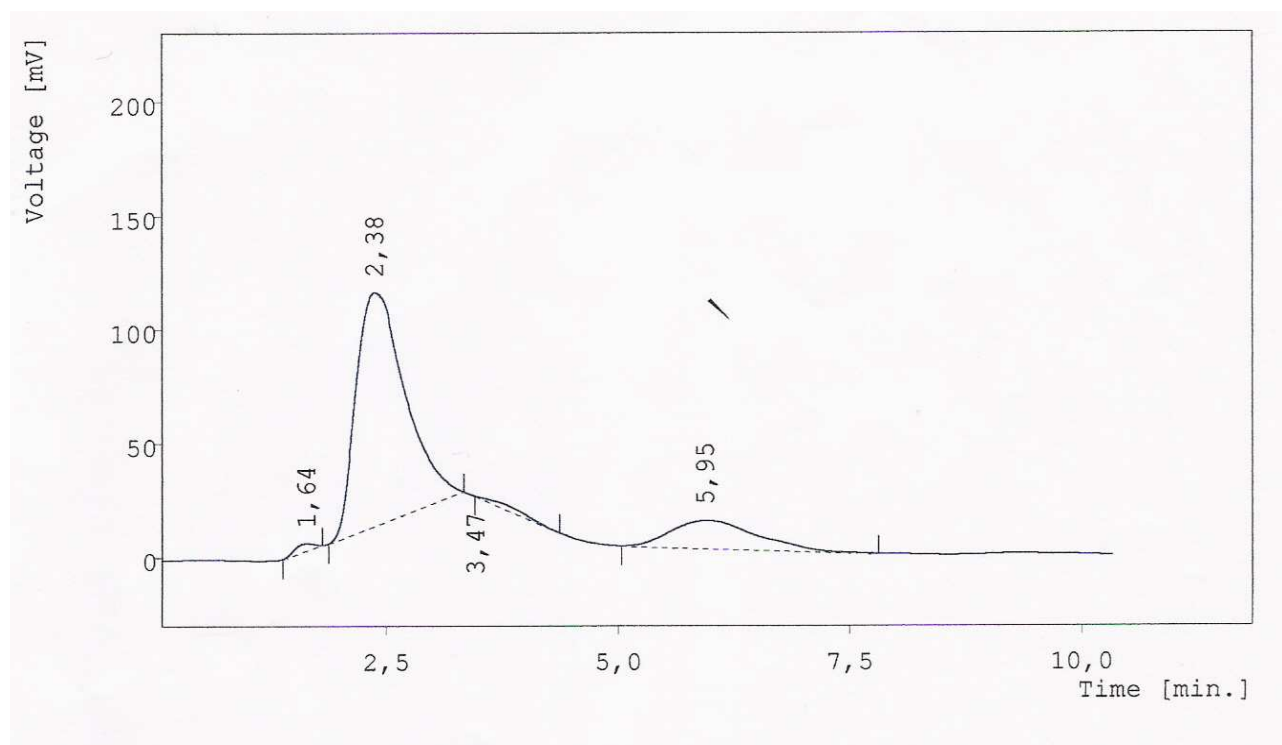


Obr 6. Kalibrační křivka

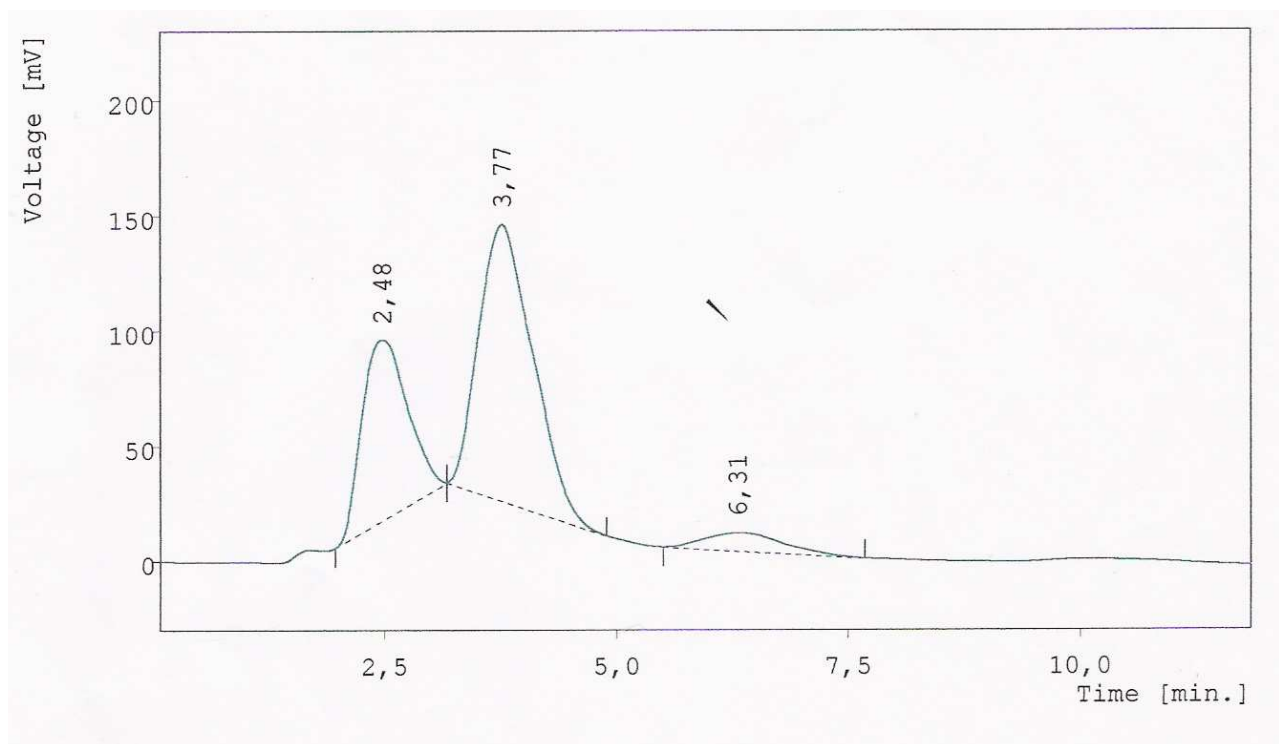
### 5.3.2 HPLC záznamy



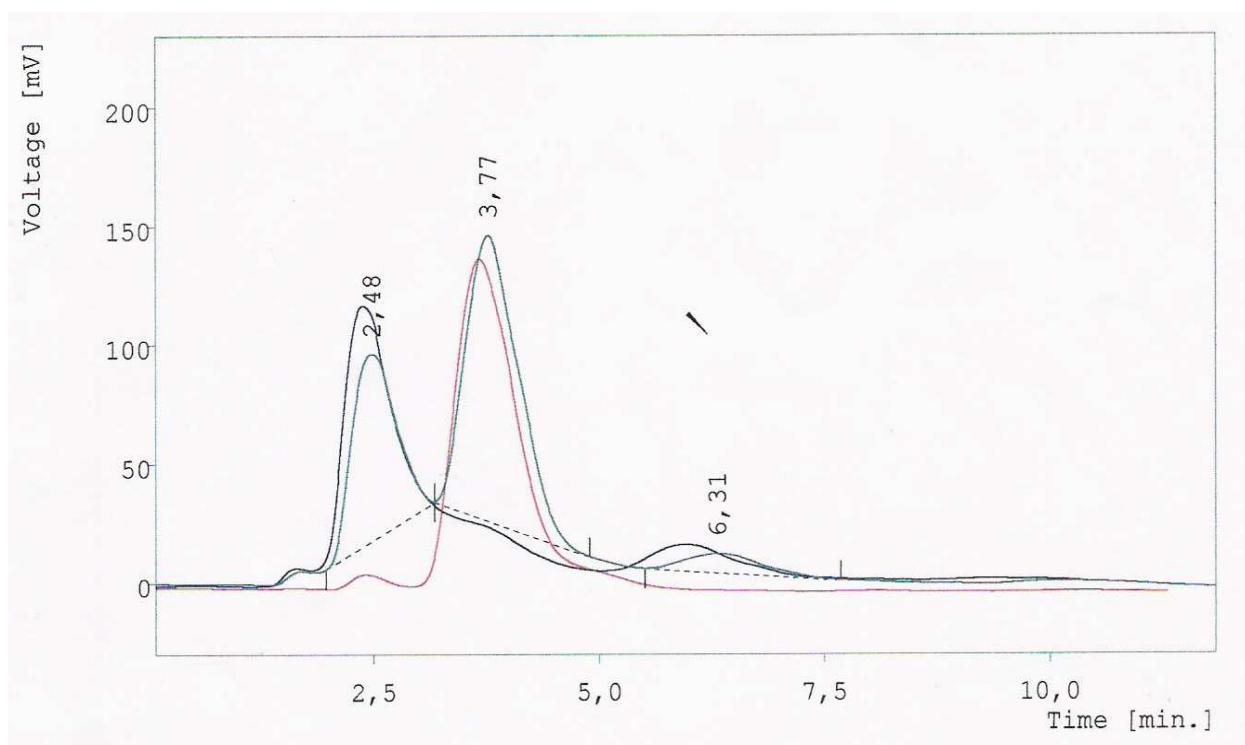
Obr 7. HPLC záznam standardu



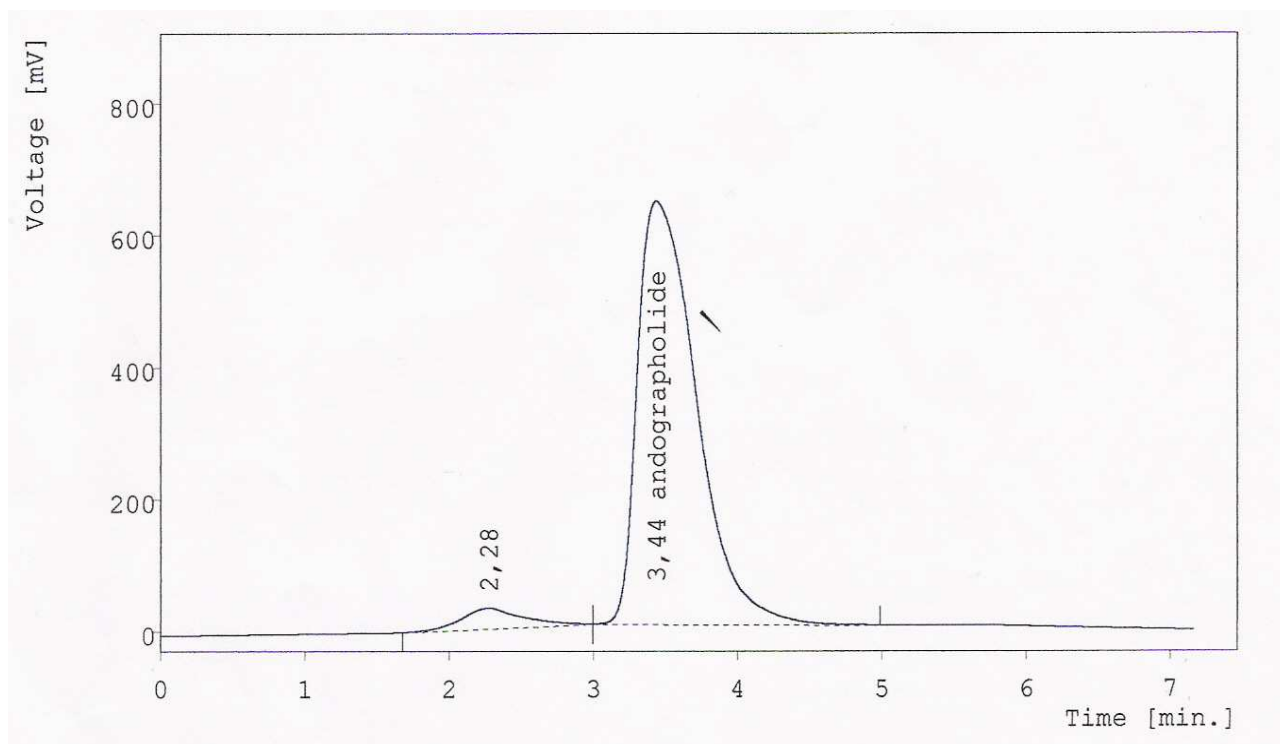
Obr 8. HPLC záznam vzorku I – celý extrakt



Obr 9. HPLC záznam standardu se vzorkem I – celý extrakt



Obr 10. Překrytí všech předchozích HPLC záznamů



Obr 11. HPLC záznam vzorku II – andrographolidy

### 5.3.3 Vyhodnocení obsahu andrographolidů

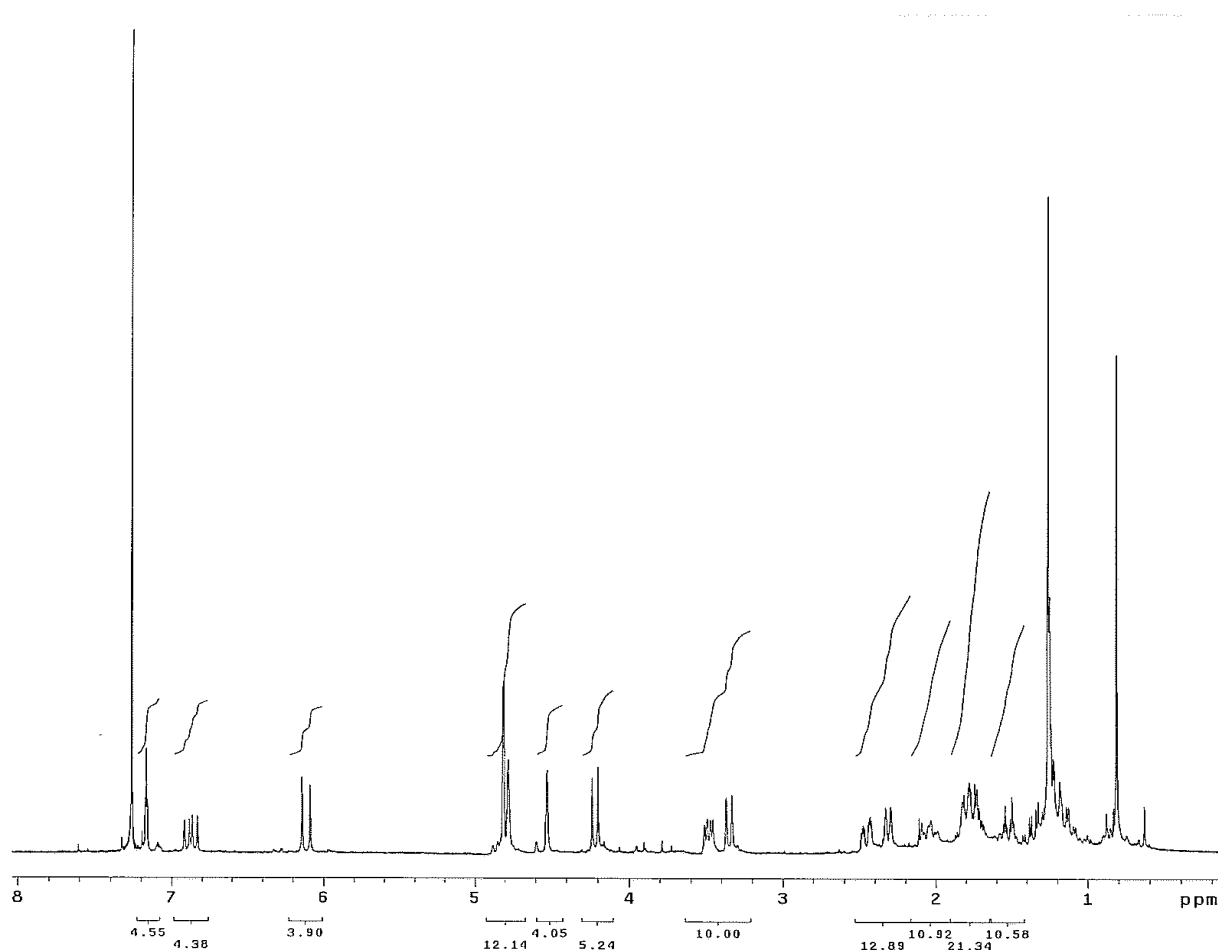
Koncentrace andrographolidů, určená na základě provedeného HPLC stanovení, vztaženého ke standardu, byla naměřena jako 97,8623  $\mu\text{g/ml}$ . Vezme-li se v úvahu zředění (viz příprava vzorku II – andrographolidy) – 1/25 a zředění přístroje 1/50, pak skutečná koncentrace andrographolidů odpovídá zaokrouhleně 0,1223 g/ml, což je 12,23 %.

## 5.4 NMR spektra hlavní obsahové složky

Data jsou prezentována v následujícím pořadí - chemický posun ( $\delta$ ), integrovaná intenzita (v protonovaných spektrech), multiplicita (s: singlet, d: dublet, t: triplet, dd: dublet dubletů, ddd dublet dubletu dubletů, m: multiplet), interakční konstanta (Hz) a přiřazení.

### 5.4.1 $^1\text{H}$ -NMR spektrum hlavní obsahové složky

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.17 (1H, t,  $J=1.9$  Hz, H14), 6.87 (1H, dd,  $J=16.2$  Hz,  $J=9.9$  Hz, H11), 6.11 (1H, d,  $J=16.2$  Hz, H12), 4.83-4.76 (3H, m, H15, H17)), 4.52 (1H, s, H17), 4.22 (1H, d,  $J=11.1$  Hz, H19), 3.48 (1H, dd,  $J=11.0$  Hz,  $J=5.2$  Hz, H3), 3.35 (1H, d,  $J=11.1$  Hz, H19), 2.45 (1H, ddd,  $J=13.7$  Hz,  $J=4.1$  Hz,  $J=2.5$  Hz, H7), 2.31 (1H, d,  $J=10.2$  Hz, H9), 2.13-1.96 (1H, m, H7), 1.88-1.66 (3H, m, H2, H6), 1.58-1.46 (1H, m, H1), 1.40-1.06 (3H, m, H1, H5, H6), 1.26 (3H, s, H18), 0.81 (3H, s, H20)

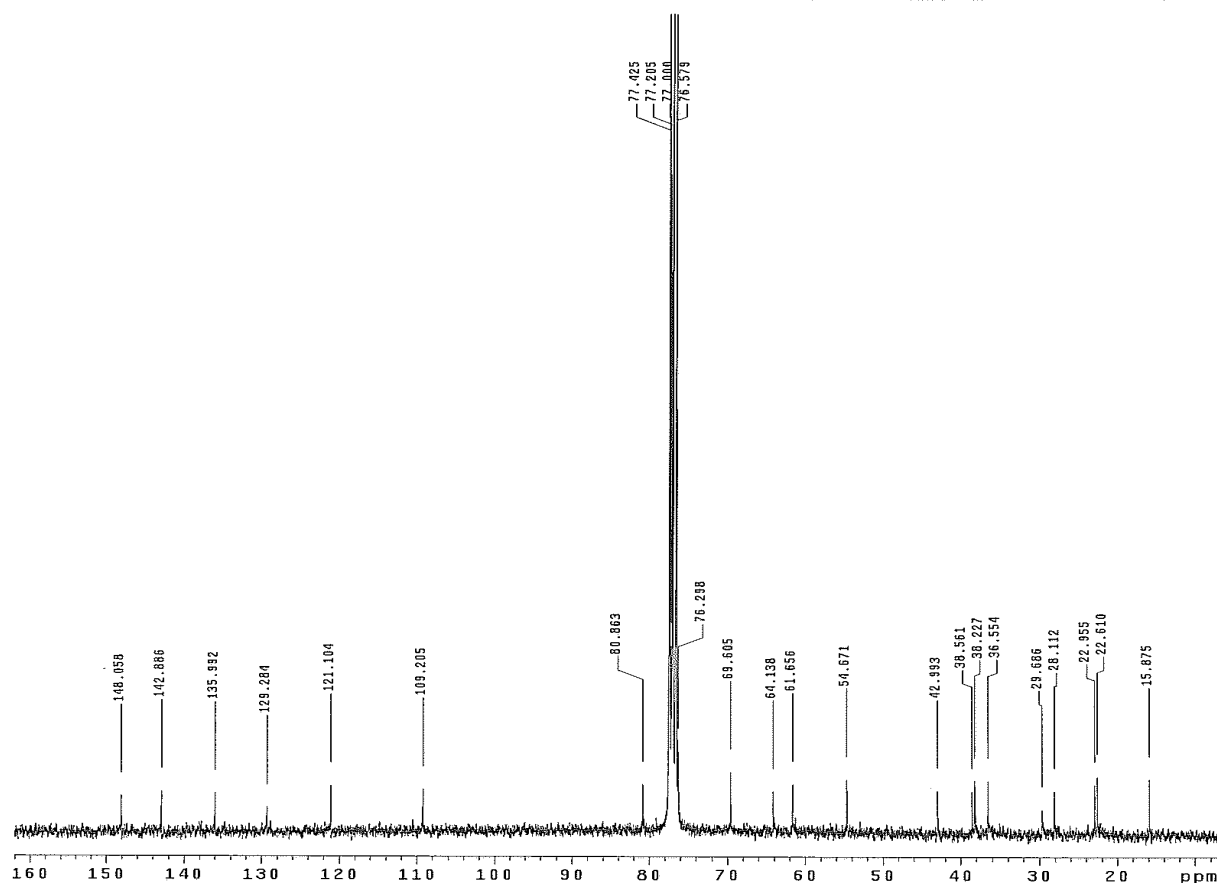


Obr. 12  $^1\text{H}$ -NMR spektrum hlavní obsahové složky



#### 5.4.2 $^{13}\text{C}$ -NMR spektrum hlavní obsahové složky

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  172.2, 148.1, 142.9, 136.0, 129.3, 121.1, 109.2, 80.9, 69.6, 64.1, 61.7, 54.7, 43.0, 38.6, 38.2, 36.6, 28.1, 23.0, 22.6, 15.9



Obr. 13  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrum hlavní obsahové složky

Porovnání naměřených NMR spekter hlavní obsahové složky s informacemi ve studované literatuře potvrdilo domněnku, stanovenou na základě TLC analýzy - za hlavní obsahovou složku lze považovat 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolid [68, 70].

## **6 DISKUSE**

*Andrographis paniculata* (Acanthaceae) je léčivá rostlina původní v některých asijských zemích. Především tradiční medicína Číny a Indie již po staletí využívá jeho rozsáhlé účinky. Jeho velký farmakologický potenciál potvrzuje i řada studií, jejichž předmětem se doposud stal. V rámci terapií je využíván především pro své protizánětlivé, antioxidační a hepatoprotektivní vlastnosti. V podobě obsahově standardizovaných extraktů je již dostupný i na evropském trhu. Ve Skandinávii, na rozdíl od ostatních evropských států, je s úspěchem používán v léčbě zánětů horních dýchacích cest již delší dobu. Střední a východní Evropou byl objeven zhruba před dvaceti lety, je tedy pro nás stále relativní novinkou. Proto je třeba věnovat pozornost nejen jeho účinnosti ale i bezpečnosti a kvalitě.

Náplní mojí diplomové práce byla analýza komerčního ethanolického extraktu z listů této rostliny. Extrakt byl analyzován jak z hlediska kvality, tak i kvantity. Výsledky byly porovnány s výrobním protokolem extraktu.

Nejprve byla provedena tenkovrstvá chromatografie za použití standardu andrographolidu. Podmínky stanovení se od původní metody [2] lišily využitím činidla Vanilín – kyselina sírová k detekci, které se vzhledem k výraznější vizualizaci skvrn lépe osvědčilo. Později byl také upraven poměr složek mobilní fáze S 1:  $\text{CHCl}_3 + \text{CH}_3\text{COCH}_3 + \text{C}_6\text{H}_6$  20:20:10 na S 2:  $\text{CHCl}_3 + \text{CH}_3\text{COCH}_3 + \text{C}_6\text{H}_6$  20:15:10, tak aby byla snížena její polarita. Rozdíl je vidět v porovnání chromatogramu 1 a chromatogramu 2, kde mají skvrny celistvější okraje. Přestože je andrographolid uváděn jako ústřední struktura tzv. labdanových diterpenoidů a společně s deoxyandrographolidem, neoandrographolidem a 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolidem je považován za hlavní složku, jak po stránce obsahu, tak zejména i účinnosti, byla jeho přítomnost v extraktu prokázána pouze ve stopovém množství. Možnou příčinou jeho rozkladu by mohla být jeho ne příliš stabilní struktura, jedná se o lakton, a také to, že byl extrakt již nějakou dobu na katedře skladován. Jedna ze studií, zabývajících se právě problémem stability *Andrographis paniculata*, uvádí, že již po jednom roce, i při uchovávání v suchu, dochází u sušených, práškových, nadzemní části k poklesu celkového obsahu laktonů až o 26 %. Tato skutečnost výrazně omezuje jak skladovatelnost, tak použitelnost byliny [4]. Na základě provedených TLC stanovení byla také označena hlavní obsahová složka extraktu a oblast pravděpodobného výskytu tzv. andrographolidů. Na základě poloh v chromatogramu 1 i 2 (konkrétní  $R_f$  původní metoda bohužel neuvádí), bylo odhadnuto, že by látka s nejvyšší koncentrací v extraktu mohla být 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolie. Barva skvrny nebyla směrodatná právě vzhledem k výše zmíněné odlišnosti detekce.

Na základě pochybností o nepřítomnosti andrographolidu, jinak vždy uváděného jako majoritní obsahové látky, byla ověřena totožnost standardu, aby byla vyloučena případná záměna ve výrobě či distribuci. Naměřená  $^1\text{H}$ - a  $^{13}\text{C}$ -NMR spektra a jejich porovnání s daty v literatuře však spolehlivě totožnost standardu potvrdila.

Výrobní protokol dodaný společně s extraktem deklaruje obsah andrographolidů ne nižší než 10 %. O způsobu, jakým byla kvantita stanovena, ale neuvádí nic. Nekonkretizuje ani pojem andrographolidy.

Vysokoučinná kapalinová chromatografie, kterou jsem využila pro stanovení obsahu já, se řídila podmínkami uvedenými ve studované literatuře – vzorky i standard byly rozpuštěny v methanolu, jako mobilní fáze byl zvolen MeOH/H<sub>2</sub>O 65:35, proběhla isokratická eluce a spektrofotometrické detekce při vlnové délce 223 nm [1]. Literatura popisuje více metod HPLC stanovení, které se kromě přístroje, kolony a předkolony liší zejména, mobilní fází a vlnovou délkou při detekci. Z důvodu snadné dostupnosti rozpouštědel a častého využití právě těchto podmínek (metoda byla uvedena ve více literárních pramenech), byla zvolena právě tato metoda.

Na základě takto provedeného HPLC stanovení, vztaženého na standard, byla určena kalibrační křivka a koncentrace andrographolidů 97,8623 µg/ml. Do úvahy bylo třeba vzít i zředění při přípravě vzorku II – andrographolidy a zředění přístroje. Skutečná koncentrace andrographolidů tak zaokrouhleně odpovídá 0,1223 g/ml. Přepočteno na procenta - 12,23 %, což je v relativní shodě s výrobním protokolem O něco vyšší obsah než deklaruje výrobní protokol může být způsoben poměrně náročným postupem přípravy vzorku. Vzorek II, andrographolidy, byl připravován s využitím preparativní tenkovrstvé chromatografie. To, jaká oblast desky bude zahrnuta, bylo ovlivněno literárními prameny. I samotná preparativní tenkovrstvá chromatografie vyžaduje vysokou zručnost a přesnost, tak aby vyloučeny případné ztráty při přípravě vzorku. Navíc bylo stanovení obsahu vztaženo pouze na jednu látku - standard andrographolid.

Posledním cílem mé diplomové práce bylo určení hlavní obsahové složky. Předběžný odhad, že by se mohlo jednat o 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolid vycházel z porovnání vyhotovených chromatogramů 1 a 2 a TLC profilu z literatury. Navíc byl zohledněn předpoklad, že by se mělo jednat o látku, uváděnou literaturou mezi významnými po stránce obsahu a v tomto případě i aktivity. Vyhotovená  $^1\text{H}$ - a  $^{13}\text{C}$ -NMR spektra v konfrontaci s údaji z literatury, pak naši domněnku potvrdila. Hlavní obsahovou složkou zkoušeného extraktu je 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolid.

Závěrem lze říci, že poněkud překvapující bylo zjištění, že je v extraktu andrographolid přítomen ve velmi malém množství, přestože je označován jako hlavní obsahová látka *Andrographis paniculata*.

Vzhledem k již odhaleným vlastnostem, se zdá, že by *Andrographis paniculata* mohl do budoucna představovat velký farmakologický potenciál v terapii řady onemocnění.

## **7 SOUHRN**

Náplní této diplomové práce byla analýza extraktu z listů *Andrographis paniculata* (Acanthaceae). Testován byl komerční ethanolický extrakt, jehož obsah andrographolidů měl být dle výrobního protokolu ne nižší než 10 %. Provedena byla stanovení kvality i kvantity.

Za použití standardu andrographolidu byla nejprve provedena tenkovrstvá chromatografie. Jako mobilní fáze byla využita směs chloroform, aceton, benzen v poměru 20:20:10, po úpravě 20:15:10. Vizualizace byla provedena postřikem činidlem Vanilín – kyselina sírová a zahřátím na 100°C. Přítomnost andrographolidu byla prokázána ve stopovém množství. Označena byla hlavní obsahová složka extraktu. Zároveň byla pro budoucí HPLC stanovení určena oblast pravděpodobného výskytu andrographolidů.

Dále proběhlo ověření totožnosti standardu. Naměřená  $^1\text{H}$ - a  $^{13}\text{C}$ -NMR spektra a jejich porovnání s daty v literatuře potvrdila, že se skutečně jedná o andrographolid.

Vysokoučinná kapalinová chromatografie proběhla za následujících podmínek - vzorky i standard byly rozpuštěny v methanolu, jako mobilní fáze byl zvolen MeOH/H<sub>2</sub>O 65:35, provedena byla isokratická eluce a spektrofotometrické detekce při vlnové délce 223 nm. Pro měření byl připraven roztok standardu o koncentraci 0,1 mg/ml a vzorek I – celý extrakt s koncentrací 500 µg/ml. Stanovení tedy proběhlo na jednu látku – standard andrographolid. Předmětem HPLC stanovení byl vzorek II – andrographolidy, který byl připraven za pomoci preparativní TLC. Obsah andrographolidů byl stanoven pomocí HPLC, metodou kalibrační křivky andrographolidu. Jeho koncentrace odpovídá 12,23 %, vztaženo na andrographolid. Zkoušený extrakt by tak, co do obsahu andrographolidů, odpovídal výrobnímu protokolu.

S využití preparativní TLC bylo získáno 7 mg hlavní obsahové složky. Tato látka byla podrobena NMR stanovením. Získaná  $^1\text{H}$ - a  $^{13}\text{C}$ -NMR spektra byla konfrontována s literaturou. Potvrzen byl původní předpoklad - za hlavní obsahovou složku testovaného extraktu *Andrographis paniculata* lze považovat 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolid.

## 8 POUŽITÁ LITERATURA

1. Handa, S. S., Mundkinajeddu, D., Mangal A. K.: *Indian herbal pharmacopoeia Volume I*, Indian Drug Manufacturers' Association and Regional Research Laboratory, Mumbai (India) 1998, s. 198
2. Anonymous: *Andrographis paniculata*. Privátní text.
3. Jahodář, L.: *Farmakobotanika – semenné rostliny*, Karolinum, Praha 2009, s. 264
4. Lomlim, L., Jirayupong, N., Plubrukarn, A.: Heat-accelerated degradation of solid-state andrographolide. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2003, 51(1), s. 24 – 6
5. Koteswara, R. Y., Vimalamma, G., Rao, C. V., Tzeng, Y. M.: Flavonoids and andrographolides from *Andrographis paniculata*. *Phytochemistry*, 2004, 65(16), s. 2317 – 2321
6. Najib Nik A Rahman, N., Furuta, T., Kojima, S., Takane, K., Ali Mohd, M.: Antimalarial activity of extracts of Malaysian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*, 1999, 64(3), s. 249-254
7. Xu, C., Chou, G. X., Wnag, Z. T.: A new diterpene from the leaves of *Andrographis paniculata* Nees. *Fitoterapia* (2010). doi: 10.1016/j.fitote.2010.03.03
8. Reddy, M. K., Reddy, M. V., Gunasekar, D., Murthy, M. M., Caux, C., Bodo, B.: A flavone and an unusual 23-carbon terpenoid from *Andrographis paniculata*. *Phytochemistry*, 2003, 62(8), s. 1271-1275
9. Reddy, V. L., Reddy, S.M., Ravikanth, V., Krishnaiah, P., Goud, T. V., Rao, T. P., Ram, T. S., Gonnade, R. G., Bhadghade, M., Venkateswarlu, Y.: A new bis-andrographolide ether from *Andrographis paniculata* nees and evaluation of anti-HIV activity. *Nat Prod Res*, 2005, 19(3), s. 223-30



10. Shen, Y. H., Li, R. T., Xiao, W. L., Xu, G., Lin, Z. W., Zhao, Q. S., Sun, H. D.: Ent-Labdane diterpenoids from *Andrographis paniculata*. J Nat Prod, 2006, 69(3), s. 319-322
11. Li, W., Xu, X., Zhang, H., Ma, C., Fong, H., van Breemen, R., Fitzloff, J.: Secondary metabolites from *Andrographis paniculata*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2007, 55(3), s. 455-458
12. Chen, L., Zhu, H., Wang, R., Zhou, K., Jing, Y., Qiu, F.: ent-Labdane diterpenoid lactone stereoisomers from *Andrographis paniculata*. J Nat Prod, 2008, 71(5), s. 852-855
13. Zhou, K. L., Chen, L. X., Zhuang, Y. L., Wang, N. L., Yao, X. S., Qiu, F.: Two new ent-labdane diterpenoid glycosides from the aerial parts of *Andrographis paniculata*. J Asian Nat Prod Res, 2008, 10(9-10), s. 939-943
14. Wang, G. C., Wang, Y., Williams, I. D., Sung, H. H. Y., Zhang, X. Q., Zhang, D. M., Jiang, R. W., Yao, X. S., Ye, W. C.: Andrographolactone, a unique diterpene from *Andrographis paniculata*. Tetrahedron Lett, 2009, 50(34), s. 4824-4826
15. Ma, X. C., Gou, Z. P., Wang, C. Y., Yao J. H., Xin, X. L., Lin, Y., Liu, K. X.: A new ent- labdane diterpenoid lactone from *Andrographis paniculata*. Chin Chem Lett, 2010, 21(5), s. 587-589
16. Radhika, P., Prasad, Y. R., Lakshmi, K. R.: Flavones from the stem of *Andrographis paniculata* Nees. Nat Prod Commun, 2010, 5(1), s.59-60
17. Singha, P. K., Roy, S., Dey, S.: Antimicrobial activity of *Andrographis paniculata*. Fitoterapia, 2003, 74(7-8), s. 692-694
18. Zaidan, M. R., Noor Rain, A., Badrul, A. R., Adlin, A., Norazah, A., Zakiah, I.: In vitro screening of five local medicinal plants for antibacterial activity using disc diffusion method. Trop Biomed, 2005, 22(2), s. 165-170

19. Gozalbes, R., Gálvez, J., García-Domenech, R., Derouin, F.: Molecular search of new active drugs against *Toxoplasma gondii*. SAR QSAR Environ Res, 1999, 10(1), s. 47-60
20. Dua, V. K., Verma, G., Dash, A. P.: In vitro antiprotozoal activity of some xanthenes isolated from the roots of *Andrographis paniculata*. Phytother Res, 2009, 23(1), s.126-128
21. Dua, V. K., Ojha, V. P., Roy, R., Joshi, B. C., Valecha, N., Devi, C. U., Bhatnagar, M. C., Sharma, V. P., Subbarao, S. K.: Anti-malarial activity of some xanthenes isolated from the roots of *Andrographis paniculata*. J Ethnopharmacol, 2004, 95(2-3), s. 247-251
22. Sheeja, K., Shihab, P. K., Kuttan, G.: Antioxidant and anti-inflammatory activities of the plant *Andrographis paniculata* Nees. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2006, 28(1), s. 129-140
23. Verma, N., Vinayak, M.: Antioxidant action of *Andrographis paniculata* on lymphoma. Mol Biol Rep, 2008, 35(4), s. 535-540
24. Lin, F. L., Wu, S. J., Lee, S. C., Ng, L. T.: Antioxidant, antioedema and analgesic activities of *Andrographis paniculata* extracts and their active constituent andrographolide. Phytother Res, 2009, 23(7), s. 958-64
25. Chandrasekaran, C. V., et al.: Effect of an extract of *Andrographis paniculata* leaves on inflammatory and allergic mediators in vitro. J Ethnopharmacol. (2010), doi:10.1016/j.jep.2010.03.007
26. Chao, W. W., Kuo, Y. H., Lin, B. F.: Anti-inflammatory activity of new compounds from *Andrographis paniculata* by NF-kappaB transactivation inhibition. J Agric Food Chem, 2010, 58(4), s. 2505-2512

27. Amroyan, E., Gabrielian, E., Panossian, A., Wiman, G., Wagner, H.: Inhibitory effect of andrographolide from *Andrographis paniculata* on PAF-induced platelet aggregation. *Phytomedicine*, 1999, 6(1), s. 27-31
28. Albu-Ghefreh A. A., Canatan, H., Ezeamuzie C. I.: In vitro and in vivo anti-inflammatory effects of andrographolide. *Int Immunopharmacol*, 2009, 9(3), s. 313-318
29. Puri, A., Saxena, R., Saxena R. P., Saxena K. C., Srivastava, V., Tandon, J. S.: Immunostimulant agents from *Andrographis paniculata*. *J Nat Prod*, 1993, 56(7), s. 995-999
30. Naik, S. R., Hule, A.: Evaluation of immunomodulatory activity of an extract of andrographolides from *Andrographis paniculata*. *Planta Med*, 2009, 75(8), s. 785-791
31. Iruretagoyena, M. I., Tobar, J. A., González, P. A., Sepúlveda, S. E., Figueroa, C. A., Burgos, R. A., Hancke, J. L., Kalergis, A. M.: Andrographolide interferes with T cell activation and reduces experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, 312(1), s. 366-372
32. Burgos, R. A., Hacke, J. L., Bertoglio, J. C., Aguirre, V., Arriagada, S., Calvo, M., Cáceres, D. D.: Efficacy of an *Andrographis paniculata* composition for the relief of rheumatoid arthritis symptoms: a prospective randomized placebo-controlled trial. *Clin Rheumatol*, 2009, 28(8), s. 931-946
33. Calabrese, C., Berman, S. H., Babish, J. G., Ma, X., Shinto, L., Dorr, M., Wells, K., Wenner, C. A., Standish, L. J.: A phase I trial of andrographolide in HIV positive patients and normal volunteers. *Phytother Res*, 2000, 14(5), s. 333-338
34. Gupta, P. P., Tandon, J. S., Patnaik, G. K.: Antiallergic activity of andrographolides isolated from *Andrographis paniculata* (Burm. F) Wall. *Pharm Biol*, 1998, 36(1), s. 72-74

35. Kapil, A., Koul, I. B., Banerjee, S. K., Gupta, B. D.: Antihepatotoxic effects of major diterpenoid constituents of *Andrographis paniculata*. *Biochem Pharmacol*, 1993, 46(1), s. 182-185
36. Visen, P. K., Shukla, B., Patnaik, G. K., Dhawan, B. N.: Andrographolide protects rat hepatocytes against paracetamol-induced damage. *J Ethnopharmacol*, 1993, 40(2), s. 131-136
37. Shukla, B., Visen, P. K., Patnaik, G. K., Dhawan, B. N.: Choloretic effect of andrographolide in rats and guinea pigs. *Planta Med*, 1992, 58(2), s. 146-149
38. Singh, P., Srivastava, M. M., Khemani, L. D.: Renoprotective effects of *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees in rats. *Ups J Med Sci*, 2009, 114(3), s. 136-139
39. Zhang, X. F., Tan, B. K.: Antihyperglycaemic and anti-oxidant properties of *Andrographis paniculata* in normal and diabetic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2000, 27(5-6), s. 358-363
40. Wibudi, A., Kiranadi, B., Manalu, W., Winatro, A., Suyono, S.: The traditional plant, *Andrographis paniculata* (Sambiloto), exhibits insulin-releasing actions in vitro. *Acta Med Indones*, 2008, 40(2), s. 63-68
41. Subramanian, R., Asmawi, M. Z., Sadikun, A.: In vitro alpha-glucosidase and alpha-amylase enzyme inhibitory effects of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide. *Acta Biochim Pol*, 2008, 55(2), s. 391-398
42. Zhao, H. Y., Fang, W. Y.: Antithrombotic effects of *Andrographis paniculata* nees in preventing myocardial infarction. *Chin Med J*, 1991, 104(9), s. 770-775
43. Thisoda, P., Rangkadilok, N., Pholphana, N., Worasuttayangkurn, L., Ruchirawat, S., Satayavivad, J.: *Andrographis paniculata* extract and its active diterpenoids on platet aggregation. *Eur J Pharmacol*, 2006, 553(1-3), s. 39-45

44. Wang, D. W., Zhao, H. Y.: Prevention of atherosclerotic arterial stenosis and restenosis after angioplasty with *Andrographis paniculata* nees and fish oil. Experimental studies of effects and mechanisms. Chin Med J (Engl), 1994, 107(6), s. 464-470
45. Zhang, C. Y., Tan, B. K.: Hypotensive activity of aqueous extract of *Andrographis paniculata* in rats. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1996, 23(8), s. 675-678
46. Guo, Z. L., Zhao, H. Y., Zheng, X. H.: The effect of *Andrographis paniculata* nees (APN) in alleviating the myocardial ischemic reperfusion injury. J Tongji Med Univ, 1994, 4(1), s. 49-51
47. Guo, Z., Zhao, H., Fu, L.: Protective effects of API0134 on myocardial ischemia and reperfusion injury. J Tongji Med Univ, 1996, 16(4), s. 193-197
48. Woo, A. Y., Waye, M. M., Tsui, S. K., Yeung, S. T., Cheng, C. H.: Andrographolide up-regulates cellular-reduced glutathione level and protects cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation injury. J Pharmacol Exp Ther, 2008, 325(1), s. 226-235
49. Poolsup, N., Suthisisang, C., Prathanturug, S., Asawamekin, A., Chanchareon, U.: *Andrographis paniculata* in the symptomatic treatment of uncomplicated upper respiratory tract infection: systematic review of randomized controlled trials. J Clin Pharm Ter, 2004, 29(1), s. 37-45
50. Kligler, B., Ulbricht, C., Basch, E., Kirkwood, C. D., Abrams, T. R., Miranda, M., Singh Khalsa, K. P., Giles, M., Boon, H., Woods, J.: *Andrographis paniculata* for the treatment of upper respiratory infection: a systematic review by the natural standard research collaboration. Explore (NY), 2006, 2(1), s. 25-29
51. Bao, Z., Guan, S., Cheng, C., Wu, S., Wong, S. H., Kemeny, D. M., Leung, B. P., Wong, W. S.: A novel antiinflammatory role for andrographolide in asthma via inhibition of the nuclear factor-kappaB pathway. Am J Respir Crit Care Med, 2009, 179(8), s. 657-665

52. Sheeja, K., Kuttan, G.: Activation of cytotoxic T lymphocyte responses and attenuation of tumor growth in vivo by *Andrographis paniculata* extract and andrographolide. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2007, 29(1), s. 81-93
53. Rajagopal, S., Kumar, R. A., Deevi, D. S., Satyanarayana, C., Rajagopalan, R.: Andrographolide, a potential cancer therapeutic agent isolated from *Andrographis paniculata*. *J Exp Ther Oncol*, 2003, 3(3), s. 147-158
54. Zhou, J., Lu, G. D., Ong, C. S., Ong, C. N., Shen, H. M.: Andrographolide sensitizes cancer cells to TRAIL-induced apoptosis via p53-mediated death receptor 4 up-regulation. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(7), s. 2170-2180
55. Zhou, J., Zhang, S., Ong, C. N., Shen, H. M.: Critical role of pro-apoptotic Bcl-2 family members in andrographolide-induced apoptosis in human cancer cells. *Biochem Pharmacol*, 2006, 72(2), s. 132-144
56. Madav, S., Tripathi, H. C., Tandan, S. K., Mishra, S. K.: Analgesic, antipyretic and antiulcerogenic effects of andrographolide. *Indian J Pharm Sci*, 1995, 57(3), s. 121-125
57. Burgos, R. A., Aguila, M. J., Santiesteban, E. T., Sánchez, N. S., Hancke, J. L.: *Andrographis paniculata* (Ness) induces relaxation of uterus by blocking voltage operated calcium channels and inhibits Ca(+2) influx. *Phytother Res*, 2001, 15(3), s. 235-239
58. Wiart, C., Kumar, Y., Yusof, M. Y., Hamimah, H., Fauzi, Z. M., Sulaiman, M.: Antiviral properties of ent-labdene diterpenes of *Andrographis paniculata* nees, inhibitors of herpes simplex virus type 1. *Phytother Res*, 2005, 19(12), s. 1069-1070
59. Lin, T. P., Chen, S. Y., Duh, P. D., Chang, L. K., Liu, Y. N.: Inhibition of the epstein-barr virus lytic cycle by andrographolide. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31(11), s. 2018-2023

60. Akbarsha, M. A., Manivannan, B., Hamid, K. S., Vijayan, B.: Antifertility effect of *Andrographis paniculata* (Nees) in male albino rat. Indian J Exp Biol, 1990, 28(5), s. 421-426
61. Burgos, R. A., Caballero, E. E., Sánchez, N. S., Schroeder, R. A., Wikman, G. K., Hancke, J. L.: Testicular toxicity assessment of *Andrographis paniculata* dried extract in rats. J Ethnopharmacol 1997, 58(3), s. 219-224
62. Allan, J. J., Pore, M. P., Deepak, M., Murali, B., Mayachari, A. S., Agarwal, A.: Reproductive and fertility effects of an extract of *Andrographis paniculata* in male Wistar rats. Int J Toxicol, 2009, 28(4), s. 308-317
63. Panossian, A., Kochikian, A., Gabrielian, E., Muradian, R., Stepanian, H., Arsenian, F., Wagner, H.: Effect of *Andrographis paniculata* extract on progesterone in blood plasma of pregnant rats. Phytomedicine, 1999, 6(3), s. 157-161
64. Chandrasekaran, C. V., Thiagarajan, P., Sundarajan, K., Goudar, K. S., Deepak, M., Murali, B., Allan, J. J., Agarwal, A.: Evaluation of the genotoxic potential and acute oral toxicity of standardized extract of *Andrographis paniculata* (KalmCold). Food Chem Toxicol, 2009, 47(8), s. 1892-1909
65. Spasov, A. A., Ostrovskij, O. V., Chernikov M. V., Wikman, G.: Comparative controlled study of *Andrographis paniculata* fixed combination, Kan Jang and an *Echinacea* preparation as adjuvant, in the treatment of uncomplicated respiratory disease in children. Phytother Reser, 2004, 18(1), s. 47-53
66. Gabrielian, E. S., Shukarian, A. K., Goukasova, G. I., Chandanian, G. L., Panossian, A. G., Wikman, G., Wagner, H.: A double blind, placebo-controlled study of *Andrographis paniculata* fixed combination Kan Jang in the treatment of acute upper respiratory tract infections including sinusitis. Phytomedicine, 2002, 9(7), s. 589-597

67. Kulichenko, L. L., Kireyeva, L. V., Malyshkina, E. N., Wikman, G.: A randomized, controlled study of Kan Jang versus amantadine in the treatment of influenza in Volgograd. *J Herb Pharmacother*, 2003, 3(1), s. 77-93
68. Suebsasana, S., Pongnaratorn, P., Sattayasai, J., Arkaravichien, T., Tiamkao, S., Aromdee, C.: Analgesic, antipyretic, anti-inflammatory and toxic effects of andrographolide derivatives in experimental animals. *Arch Pharm Res*, 2009, 32(9), s. 1191 – 1200
69. Chen, Z. G., Tan, R. X., Cao, L.: Efficient and highly regioselective acylation of andrographolide catalyzed by lipase in acetone. *Green Chem*, 2009, 11, s. 1743 - 1745
70. He, X., Li, J., Gao, H., Qiu, F., Cui, X., Yao, X.: Six new andrographolide metabolites in rats. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2003, 51(5), s. 586 – 589



## **9 ABSTRAKT**

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE

**Analýza extraktu z listů *Andrographis paniculata*.**

Marta Tonarová, 2010

**Abstrakt:** Byla provedena analýza extraktu z listů *Andrographis paniculata* (Acanthaceae). Zkoušený materiál představoval komerční ethanolický extrakt s obsahem andrographolidů ne nižším než 10 %. Tenkovrstvá chromatografie, za použití standardu andrographolidu, prokázala jen jeho stopové množství v extraktu, přestože literatura uvádí jeho obsah jako majoritní. Totožnost standardu byla ověřena naměřením jeho NMR spekter, která odpovídala údajům ve studované literatuře. Obsah andrographolidů byl stanoven vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií, vztaženo na standard, s využitím isokratické eluce a spektrofotometrické detekce při vlnové délce 223 nm. Celkový obsah andrographolidů ve vzorku činil 12,23 % a odpovídal tedy výrobnímu protokolu. Hlavní obsahová složka extraktu byla izolována za pomoci preparativní tenkovrstvé chromatografie. Na základě stanovení NMR spekter a jejich konfrontace s literaturou byla určena jako 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolid.

CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE  
FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ  
DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL BOTANY AND ECOLOGY

**Analysis of Andrographis leaves extract.**

Marta Tonarová, 2010

**Abstract:** The analysis of the extract of leaves *Andrographis paniculata* (Acanthaceae) was accomplished. The commercial ethanol extract with the contents of andrographolides not higher than 10 % represented the tested material. In case of using the standard andrographolide, the thin layer chromatography has proved its very low amount in the extract only, in spite of the fact that studying literature considers its contents as majority. The identity of the standard was verified by measuring its NMR spectrums, which refers to the informations in the studying literature. Contents of andrographolides was fixed by the high performance liquid chromatography extended to the standard, with using of isocratic elution and spectrophotometric detection by the wave length 223 nm. Total contents of the andrographolides in the extract was 12,23 % and consequently it refers to the production protocol. The main component in the contents of the extract was isolated by using preparative TLC. On the basis of fixing the NMR spectrums and their confrontation with the studying literature it was determined as 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide.